



Joana Rita Lourenço Sousa

Licenciada em Bioquímica

**Proteómica Microbiana: análise
comparativa da bactéria redutora de
sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC
27774 e das actinobactérias *Salinispora
arenicola* e *Salinispora pacifica***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientadora: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida, Investigadora,
REQUIMTE/CQFB – FCT/UNL
Professora Auxiliar, Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas Moniz

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro
Arguente: Prof. Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz
Vogal: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro 2014

Joana Rita Lourenço Sousa

Licenciada em Bioquímica

**Proteómica Microbiana: análise comparativa da
bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio*
desulfuricans ATCC 27774 e das actinobactérias
Salinispora arenicola e *Salinispora pacifica***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientadora: Prof^a Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida, Investigadora,
REQUIMTE/CQFB – FCT/UNL
Professora Auxiliar, Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas Moniz

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro
Arguente: Prof. Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Siniz
Vogal: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida

Novembro 2014

Proteómica Microbiana: análise comparativa da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 e das actinobactérias *Salinispora arenicola* e *Salinispora pacifica*.

Copyright © Joana Rita Lourenço Sousa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Primeiramente quero expressar a minha gratidão à Prof^a Doutora Maria Gabriela Almeida, por me ter aceitado no seu grupo, pelo seu apoio, incentivo, ensinamentos, conhecimentos, pela sua confiança e, por me ter aberto horizontes na área de investigação.

Quero agradecer à Doutora Célia Silveira pela ajuda preciosa que me deu ao longo deste ano, pela partilha do seu conhecimento a nível científico, assim como de metodologias de trabalho e por me ter aturado e animado inúmeras vezes.

Ao Doutor José Moura e à Doutora Isabel Moura por terem cedido os laboratórios para a realização desta tese.

Aos restantes membros dos grupos Bioln e BioProt, Rute Nunes, Olga Mestre, Cíntia Carreira, Cláudia Nóbrega e Doutora Susana Ramos pela vossa ajuda ao longo deste ano. Em especial à Doutora Luísa Maia pela sua ajuda em algumas situações, à Mestre Ana Teresa Lopes, porque sem ela nem metade do trabalho teria realizado e ao Doutor Rui Almeida pelo seu conhecimento e pelo auxílio prestado na *French Press*

Aos membros da Bioscope, em especial ao Doutor José Luis Capelo e ao Doutor Hugo Santos e pela disponibilidade e simpatia. Sem eles seria-me impossível continuar o meu trabalho. Obrigada!

À Doutora Susana Gaudêncio por me ter dado a oportunidade de conhecer o “mundo” das Actinobactérias marinhas, pela sua ajuda e disponibilidade.

Aos meus colegas de Laboratório e de gabinete: Luís Fonseca, Francisco Oliveira, Ana Gonçalves, Lara Santos, pela vossa paciência e por partilharem momentos que se tornaram úteis ao longo deste caminho.

À minha colega de mestrado, de laboratório, de gabinete e amiga Raquel Amador, por me ter acompanhado por mais um ano, por ter partilhado o seu conhecimento, por me ter ajudado em situações que sem ela não tinha conseguido superar, pelas conversas e risadas dadas ao longo do ano, pela sua paciência, pelos seus maravilhosos conselhos. Muito obrigada pela tua amizade e que esta dure por muito tempo. ☺

À minha colega de bancada e amiga Patrícia Rodrigues pela sua ajuda preciosa, pelo seu conhecimento em várias áreas, pelo apoio e conselhos e pela companhia no trabalho muitas vezes até tarde. E claro, pelas nossas conversas que faziam os dias parecerem menos pesados.

Ao meu colega de laboratório Tiago Monteiro, pela ajuda, pela companhia nas “noitadas” e que apesar de ser mais recente no laboratório, proporcionou vários momentos alegres mesmo em dias que não apetecia sequer esboçar um sorriso.

Ao Pedro Fontes e Rute Português, que de um certo modo contribuíram para o crescimento da minha pessoa e deram-me a conhecer as minhas próprias capacidades de ensinar.

Aos meus “novos” colegas, Cláudia Fernandes, Isabel Silva e Tiago Dias pelos bons momentos passados e pelas conversas animadoras.

Às minhas meninas alentejanas, em particular à Catarina Nobre pela sua ajuda, conselhos e pelos momentos que partilhamos ao longo destes anos todos. Andámos e conseguimos alcançar mais uma etapa!! Que venham mais ☺

Às minhas meninas ribatejanas pela força e pelas belas “férias” que passámos juntas. Em especial, à Liliana Santos, por me ter aturado nos últimos tempos, pela sua comidinha boa e pelo seu apoio ao longo deste ano. Mesmo perto ou não mostraste-me que a amizade resiste a tudo é só querermos. ☺

Aos meus amigos, em particular ao Mário Henriques, pela sua amizade, pelos momentos ótimos de distração que me proporcionaste e pelas palavras de apoio. À Juliana Rocha e à sua filha maravilhosa, a Margarida, por me terem facultado momentos únicos ao longo desta etapa. E a todos os que não mencionei mas, que de certa forma contribuíram neste percurso.

À minha amiga Maria Rocha por me ter acompanhado ao longo destes anos, pelo seu apoio incondicional, pela sua paciência, por me ter aberto os olhos em muitas situações, pela partilha de momentos bons e outros menos bons, pelos teus conselhos e por seres uma irmã mais velha que nunca tive. Muito obrigada!

Ao meu irmão, porque apesar dos nossos desentendimentos estiveste sempre ao meu lado quando precisava. Aos meus tios e primo, que mesmo longe tiveram sempre uma palavra amiga e de conforto.

Um agradecimento muito especial aos meus pais, porque sem eles não estaria aqui. Muito obrigada por me darem sempre apoio, pela educação que me deram e por acreditarem sempre em mim. Estou-vos super grata!

Finalmente, à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e à FEDER pelo financiamento através dos projectos nº PTDC/QUI-QUI/119116/2010, PEst-C/EQB/LA0006/2013 e PEst-OE/BIA/UI0457/2011-CREM, bem como ao Sétimo Programa Quadro da União Europeia (FP7/2007-2013) sob o acordo nº PCOFUND-GA-2009-246542 e nº 269138-NanoGuard.

Resumo

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são um grupo diversificado de micro-organismos anaeróbios que obtêm energia a partir da redução dissimilativa do sulfato. Algumas espécies de BRS possuem versatilidade a nível respiratório, como é o caso de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, devido à utilização de aceptadores finais de eletrões alternativos. Neste contexto, o objetivo da primeira parte desta dissertação consistiu na identificação das ferramentas metabólicas (proteínas) envolvidas na flexibilidade respiratória desta bactéria induzidas por diferentes aceptadores de eletrões (nitrato vs sulfato). Assim, os extratos proteicos totais de células de *D. desulfuricans* crescidas em meios VMN com nitrato ou sulfato, foram analisados por eletroforese bidimensional (2DE), num gradiente de pH 4 - 7. Nas condições experimentais testadas, foram observados 604 e 519 *spots* de proteínas nos géis de células crescidas em meio contendo nitrato ou sulfato, respetivamente. Pela avaliação estatística foi possível observar aproximadamente 25 % de *spots* diferenciais. Os resultados obtidos sugerem que na presença de nitrato, a bactéria não só cresce mais rapidamente e com maior rendimento, como também produz uma maior quantidade de proteínas. Estes dados foram relacionados com a adaptação de *D. desulfuricans* ao substrato respiratório alternativo. Tal como esperado, nos ensaios das atividades enzimáticas das redutases do nitrito e do nitrato, foi possível observar maior atividade nos extratos das células crescidas em nitrato do que em sulfato.

As actinobactérias marinhas do género *Salinispora*, têm vindo a ser exploradas como fontes de biofármacos naturais. Assim, na segunda parte deste trabalho, realizou-se um estudo preliminar, que pretendeu caracterizar as proteínas envolvidas na biossíntese destes compostos bioactivos em *S. arenicola* e de *S. pacifica*. Para tal, foi utilizada uma abordagem proteómica diferencial, baseada em 2DE. Surpreendentemente, os perfis proteicos das duas espécies mostraram-se bastante distintos, tendo-se identificado apenas 37 *spots* comuns entre os 650 observados no gel de *S. arenicola* e 510 no gel de *S. pacifica*.

Palavras-chave: 2D, actinobactérias marinhas, SRB, flexibilidade respiratória, metabolitos secundários, proteómica diferencial

Abstract

Sulfate reducing bacteria (SRB) are a diverse group of anaerobic microorganisms that obtain energy from the dissimilatory reduction of sulfate. Some SRB species have high respiratory versatility due to their ability to use alternative electron acceptors. In this context, the objective of the first part of this dissertation was to identify the tools involved in the respiratory flexibility of *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 induced by different electron acceptors (nitrate vs sulfate).

Thus, the total protein extracts of *D. desulfuricans* cells grown in VMN media with nitrate or sulfate, were analyzed by two-dimensional electrophoresis (2DE). In the experimental conditions tested (pH 4 - 7), 604 and 519 protein spots were observed on the gels of cells grown in nitrate and sulfate medium, respectively. After protein matching and statistical validation approximately 25% of differential spots were detected. These results suggest that in the presence of nitrate the bacterium grows faster and to higher yield, moreover, a greater number of proteins is produced. This behavior was related with the adaptation of *D. desulfuricans* to the alternative respiratory substrate. The nitrite and nitrate reductases activity in the total protein extracts of *D. desulfuricans* cells were measured by solution assays and / or polyacrylamide gels with native electrophoresis separation. With both techniques, we observed an increased activity in extracts of cells grown in nitrate in comparison with sulfate.

The marine actinomycetes, such as species from the genus *Salinispora*, have been explored as natural sources of biopharmaceutical products. Along this lines, in the second part of this work, we aimed at characterizing the proteins involved in the synthesis of the bioactive compounds in *S. arenicola* and *S. pacifica*. Thus, a differential proteomic approach was employed based on 2DE. The protein profiles were quite different, with only 37 common spots out of the 650 observed in *S. arenicola* gel and 510 in *S. pacifica* gel.

Keywords: 2D, marine actinomycetes, BRS, respiratory flexibility, secondary metabolites, differential proteomics

Índice Geral

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice Geral	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Símbolos	xix
1 Introdução.....	1
1.1 Bactérias Redutoras de Sulfato.....	1
1.1.1 Ciclo do Enxofre	1
1.1.1.1 Redução Dissimilativa do Sulfato	2
1.1.2 Ciclo do Azoto	7
1.1.2.1 Redução Dissimilativa do Nitrato a Ião Amónia	8
1.1.2.2 Redutase do Nitrato - Nap.....	9
1.1.2.3 Redutase do Nitrito - NiR.....	10
1.1.3 Género <i>Desulfovibrio</i>	11
1.1.3.1 <i>Desulfovibrio Desulfuricans</i> ATCC 2774	13
1.1.4 Estudos de Proteómica	18
1.1.4.1 Proteómica nas BRS	19
1.1.5 Objetivos.....	20
1.2 Actinobactérias Marinhas	21
1.2.1 Origem e Diversidade de Actinobactérias Marinhas	24
1.2.2 Isolamento e Identificação de Actinobactérias Marinhas	24
1.2.3 Género <i>Salinispora</i>	25
1.2.3.1 Metabolitos Secundários de <i>Salinispora</i> spp.	27
1.2.4 Proteómica	29
1.2.5 Objetivos.....	30
2 Materiais e Métodos	33
2.1 Bactérias Redutoras de Sulfato.....	33
2.1.1 Reagentes	33
2.1.2 Equipamentos.....	34

2.1.3	Crescimento Celular	35
2.1.4	Preparação da amostra	37
2.1.5	Quantificação de Proteína	37
2.1.6	SDS-PAGE (1D)	37
2.1.7	Eletroforese Bidimensional (2D)	38
2.1.7.1	Reidratação da strips	38
2.1.7.2	1ª Dimensão – Focagem Isoelétrica	38
2.1.7.3	Equilíbrio das strips	38
2.1.7.4	2ª Dimensão – SDS-PAGE	39
2.1.8	Coloração do Gel	39
2.1.9	Análise dos Géis 2D	39
2.1.10	Ensaio Enzimáticos	40
2.1.11	Ensaio de Atividade em Géis de Poliacrilamida Nativos	42
2.2	Actinobactérias Marinhas	44
2.2.1	Reagentes	44
2.2.2	Equipamentos	44
2.2.3	Crescimento das Bactérias e Preparação da Amostra	45
2.2.4	Quantificação de Proteína	45
2.2.5	Eletroforese Bidimensional (2D)	45
2.2.5.1	Reidratação das strips	45
2.2.5.2	1ª Dimensão - Focagem Isoelétrica	46
2.2.5.3	Equilíbrio das strips	46
2.2.5.4	2ª Dimensão - SDS-PAGE	46
2.2.6	Coloração do Gel	46
2.2.7	Análise do Géis 2D	46
3	Resultados e Discussão	49
3.1	Bactérias Redutoras do Sulfato	49
3.1.1	Crescimento Celular	49
3.1.2	Quantificação de Proteína	51
3.1.3	Eletroforese 2D	54
3.1.4	Ensaio Enzimáticos	63
3.1.4.1	Ensaio em Solução - Otimização do Tempo do Ensaio	63
3.1.4.2	Atividade da Redutase do Nitrito	65
3.1.4.3	Ensaio de Atividade em Géis de Poliacrilamida Nativos	66
3.2	Actinobactérias Marinhas	70

3.2.1	Quantificação de Proteína	70
3.2.2	Eletroforese 2D.....	72
4	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	77
5	Referências Bibliográficas	83

Índice de Figuras

Figura 1.1: Ciclo biogeoquímico do enxofre.....	1
Figura 1.2: Redução dissimilativa do sulfato pela via direta (A) e pela via do tritionato (B). 1 – sulfurilase de ATP; 2 – redutase do APS; 3 – redutase dissimilativa do sulfito; 4 – redutase do tritionato e 5 – redutase do tiosulfato	2
Figura 1.3: Estruturas cristalinas da sulfurilase de ATP de (A) <i>S. cerevisiae</i> (codificado pelo gene <i>MET3</i>), (código de PDB:1G8F) que contém como cofatores o íon magnésio (Mg^{2+}) e o íon cádmio (Cd^{2+}) e de (B) <i>P.chrisogenum</i> (código de PDB:1I2D).....	4
Figura 1.4: Estrutura da redutase de APS em <i>D. gigas</i> contendo uma molécula de FAD e dois centros de ferro-enxofre [4Fe-4S] como cofatores (código de PDB:3GYX).	5
Figura 1.5: Estrutura da redutase de sulfito de (A) <i>A. fulgidus</i> e (B) <i>E. coli</i> (código de PDB:1AOP). Ambas as redutases contêm centros de ferro-enxofre [4Fe-4S] e um sirohemo como cofatores. ¹⁶ ..	6
Figura 1.6: Ciclo biogeoquímico do azoto.	8
Figura 1.7: Enzimas envolvidas no DNRA: (A) redutase do nitrato periplasmática (NapAB) e (B) complexo NrfHA.	9
Figura 1.8: Estrutura da redutase de nitrato de (A) <i>E. coli</i> (código de PDB:2NYA) e (B) <i>Rhodobacter Sphaeroides</i>	10
Figura 1.9: Estrutura da redutase do nitrito de (A) <i>S. deleyianum</i> (código de PDB: 1QDB) (B) <i>E. coli</i> (C) <i>D. desulfuricans</i> e (D) <i>W. succinogenes</i> e seus respectivos cofatores (hemos do tipo c).	11
Figura 1.10: Árvore filogenética de bactérias redutoras de sulfato baseada nas sequências de 16S rRNA.	12
Figura 1.11: Fotos representativas das células de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 crescidas em meio contendo nitrato (A) e em meio contendo sulfato (B) obtidas por microscopia eletrônica (ampliação 1000x).	14
Figura 1.12: Estrutura tri-dimensional de Nap de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774 com Mo-bisMGD e um centro de ferro-enxofre [4Fe-4S] como cofatores	15
Figura 1.13: Redutase dissimiliativa do nitrito (NiR). (A) Estrutura de NrfA (B) arranjo espacial relativo dos grupos hemos <i>D.desulfuricans</i> ATCC 27774. ^{30,49}	16
Figura 1.14: Metabolismo do enxofre realizado por <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774. As principais enzimas envolvidas na redução dissimilativa do sulfato encontram-se indicadas com setas vermelhas. 2.7.7.4 – redutase do APS; 1.8.99.1– redutase dissimilativa do sulfito.	17
Figura 1.15: Metabolismo do azoto realizado por <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774. As principais enzimas envolvidas na redução dissimilativa do nitrato encontram-se indicadas com setas vermelhas. 1.7.99.4 – redutase do nitrato; 1.7.2.2. – redutase do nitrito.	17

Figura 1.16: Árvore filogenética da classe Actinobacteria baseada na sequência 16S rRNA. As famílias contendo membros sujeitos ao sequenciamento completo do genoma estão destacadas a negrito.....	22
Figura 1.17: Diferentes morfologias dos organismos pertencentes ao filo <i>Actinobacteria</i> (A) micrografia eletrônica (<i>Electron Micrograph</i> - EM) de uma espécie de <i>Micrococcus</i> isolada a partir de âmbar; (B) foto da espécie <i>Arthrobacter globiformis</i> após 24 h de crescimento; (C) aparência microscópica de espécies do gênero <i>Nocardia</i> e (D) imagem obtida por microscopia eletrônica de varrimento (<i>Scanning Electron Microscopy</i> – SEM) de uma espécie pertencente ao gênero <i>Streptomyces</i> (as setas indicam o micélio ramificado)	23
Figura 1.18: Árvore radial retratando as relações filogenéticas de 13 grupos de derivados de actinobactérias marinhas em seis famílias diferentes. Encontra-se incluído o gênero <i>Salinispora</i> (MAR 1), assim como o grupo MAR 2 para o qual uma descrição formal como gênero <i>Malinispora</i> ainda se encontra em progresso. A classificação taxonômica dos outros grupos MAR ainda permanece incerta, mas é provável que incluam novas espécies.....	26
Figura 1.19: Colônias de actinobactérias de pigmentação diversa características do gênero <i>Salinispora</i>	27
Figura 1.20: Metabólitos secundários produzidos pelas espécies <i>S. tropica</i> (a vermelho) e <i>S. arenicola</i> (a azul).....	28
Figura 1.21: Metabólitos secundários produzidos pela espécie <i>S. pacifica</i>	29
Figura 2.1: Esquema do protocolo experimental para a obtenção dos proteomas de <i>D. desulfuricans</i> por eletroforese 2D.....	40
Figura 2.2: Reação química e os modelos esquemáticos da redução do nitrito mediada pelo vilogénio de metilo e reduzido quimicamente pelo ditionito de sódio.....	42
Figura 2.3: Esquema reacional do método de Griess.....	42
Figura 2.4: Curva de calibração para doseamento do nitrito, com base na reação colorimétrica do método de Griess ($y = 0,023x + 0,022$; $r^2 = 0,999$). Os valores correspondem à média de duplicados.....	42
Figura 2.5: Reação química e os modelos esquemáticos da redução do nitrato mediada pelo vilogénio de metilo e reduzido quimicamente pelo ditionito de sódio.....	43
Figura 3.1: Curvas de crescimento de células de <i>D. desulfuricans</i> em meio contendo nitrato (♦) e sulfato (▪) no trabalho realizado em 2014 (A) e em 2008 (B). Os valores no gráfico A são a mediana de três valores individuais.	49
Figura 3.2: Curvas de calibração utilizadas para quantificação das amostras da bactéria <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 por (A) <i>BioRad Protein Assay</i> ($y = 1,479x - 0,012$; $r^2 = 0,996$) e (B) <i>2D Quant kit</i> ($y = -0,006x + 0,848$; $r^2=0,992$). A proteína utilizada como padrão foi BSA. Em ambos os gráficos os valores correspondem à média de duplicados.	52

- Figura 3.3:** Mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 crescidas em meio contendo nitrato. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 18 cm de pH 4 - 7, seguido por electroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*] 54
- Figura 3.4:** Mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 crescidas em meio contendo sulfato. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 18 cm de pH 4 - 7, seguido por electroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*] 55
- Figura 3.5:** *Spots* diferenciais do mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 crescidas em meio contendo nitrato de acordo com os critérios *fold change* maior que 2 e ANOVA menor que 0,05. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 18 cm de pH 4 - 7, seguido por electroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*] 61
- Figura 3.6:** *Spots* diferenciais do mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 crescidas em meio contendo sulfato de acordo com os critérios *fold change* maior que 2 e ANOVA menor que 0,05. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 18 cm de pH 4 - 7, seguido por electroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*] 62
- Figura 3.7:** Curvas de atividade da redutase do nitrito ao longo do tempo em células de *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato (A) e em meio contendo sulfato (B). Os ensaios foram realizados a 37 °C com uma mistura reacional contendo 0,5 mM de MV como mediador, 0,5 mM de nitrito de sódio como substrato em tampão fosfato pH 7,6; extrato proteico células crescidas em meio contendo nitrato (0,03 mg/mL) e sulfato (0,25 mg/mL) e 0,8 mM de ditionito de sódio como reagente redutor. 64
- Figura 3.8:** Géis de atividade de redutase do nitrito nos extratos proteicos de células *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo sulfato ou nitrato. Gel A – controlo sem substratos; A1 – células crescidas em meio contendo nitrato, A2 – ccNiR pura, A3 – células crescidas em meio contendo de sulfato. Géis B e C – incubação com nitrito de sódio; B1 – células crescidas em meio contendo nitrato, B2 – células crescidas em meio contendo de sulfato, C1 – ccNiR pura. Foram aplicadas 8,4 µg de cada extrato proteico e 10 µg de ccNiR. O gel A foi corado com uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato pH 7,6, 0,6 mM de MV e 6 mM de ditionito de sódio. Os géis B e C foram corados com uma solução igual à anterior com 20 mM de nitrito de sódio como substrato. Os géis foram incubados durante 10 minutos. Géis de poliacrilamida nativos (12,5%) [imagens obtidas a partir do *software MagicScan 32 v5.0*] 66
- Figura 3.9:** Géis de atividade de redutase do nitrato nos extratos proteicos de células *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo sulfato ou nitrato. Gel A - controlo sem substratos; A1 - células crescidas em meio contendo nitrato, A2 – ccNiR, A3 – células crescidas em meio contendo de sulfato. Géis B e C – incubação com nitrato de sódio; B1 – células crescidas em meio contendo

nitrito, B2 – células crescidas em meio contendo de sulfato, C1 – ccNiR pura. Foram aplicadas 8,4 µg de cada extrato proteico e 10 µg de ccNiR. O gel A foi corado com uma solução contendo 100 mM de tampão fosfacto pH 7,6, 0,6 mM de MV e 6 mM de ditionito de sódio. Os géis B e C foram corados com uma solução igual à anterior com 100 mM de nitrito de sódio como substrato. Os géis foram incubados durante 10 minutos. Géis de poliacrilamida nativos (12,5%) [imagens obtidas a partir do *software MagicScan 32 v5.0*] 68

Figura 3.10: Géis de atividade de redutase do nitrito nos extratos proteicos de células *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo sulfato ou nitrito. Gel A – incubação com nitrito de sódio durante 10 minutos; A1 – células crescidas em meio contendo nitrito, A2 – ccNiR pura, A3 – células crescidas em meio contendo de sulfato. Gel B – incubação com nitrito de sódio durante 15 minutos; B1 – células crescidas em meio contendo nitrito, B2 – ccNiR pura, B3 - células crescidas em meio contendo de sulfato. Gel C – incubação com nitrito de sódio durante 20 minutos; C1 – células crescidas em meio contendo nitrito, C2 – ccNiR pura, C3 - células crescidas em meio contendo de sulfato. Foram aplicadas 8,4 µg de cada extrato proteico e 10 µg de ccNiR. Os géis foram corados com uma solução contendo 100 mM de tampão fosfacto pH 7,6, 0,6 mM de MV, 100 mM de nitrito de sódio e 6 mM de ditionito de sódio. Géis de poliacrilamida nativos (12,5%) [imagens obtidas a partir do *software MagicScan 32 v5.0*] 69

Figura 3.11: Curvas de calibração utilizadas para a quantificação das amostras das actinobactérias *S. arenicola* e *S. pacífica* pelo (A) método de Bradford ($y = 1,064x - 0,002$; $r^2 = 0,999$) e (B) pelo método de *2D Quant Kit* ($y = -0,007x + 0,884$; $r^2 = 0,990$). A proteína utilizada como padrão foi BSA. Em ambos os gráficos os valores correspondem à média de duplicados. 70

Figura 3.12: Mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *S. arenicola*. As proteínas foram separadas em *strips* de 13 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal. Os *spots* representados correspondem aos *spots* de proteínas comuns [imagem obtida no *software Melanie 7.0*] 72

Figura 3.13: Mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *S. pacífica*. As proteínas foram separadas em *strips* de 13 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5 % de acrilamida. Os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal. Os *spots* representados correspondem aos *spots* de proteínas comuns [imagem obtida no *software Melanie 7.0*.] 73

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Composição do meio de crescimento de bactérias redutoras de sulfato. O pH foi ajustado para 7,45 - 7,55 com KOH. A solução foi desarejada e esterilizada na autoclave por cerca 20 min a 120 °C.	36
Tabela 2.2: Composição de 200 mL da solução de vitaminas. O pH foi ajustado para 7,4 com tampão tris-HCl 50 mM após dissolução da riboflavina com NaOH 1 M. A solução foi esterilizada com filtros de 0,2 µm.	36
Tabela 2.3: Composição do elixir de Wolfes. O pH foi ajustado para 6,5 - 7,0 com KOH.	36
Tabela 3.1: Taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (Td) das células de <i>D. desulfuricans</i> crescidas em meio contendo nitrato e sulfato em 2008 e em 2014.	50
Tabela 3.2: Valores de concentração de proteína total para as amostras de <i>D. desulfuricans</i> . Foram realizados duplicados para cada amostra, que por sua vez correspondem a triplicados biológicos de crescimentos em meio contendo nitrato e sulfato.	53
Tabela 3.3: <i>Spots</i> diferenciais nos proteomas dos extratos proteicos de células de <i>D. desulfuricans</i> quando crescidas em meio contendo nitrato (N) ou sulfato (S).	57
Tabela 3.4: Valores de atividade da redutase do nitrito em extratos proteicos de células de <i>D. desulfuricans</i> crescidas em meio contendo nitrato e sulfato. * 1 U = 1 µmol nitrito consumido por minuto.	65
Tabela 3.5: Valores de concentração de proteína total das amostras de células das actinobactérias <i>S. arenicola</i> e <i>S. pacifica</i> . (estes valores correspondem à média de duas leituras independentes) 71	

Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Símbolos

2D – Bidimensional

2DE – Eletroforese bidimensional (do inglês *two Dimensional gel Electrophoresis*)

A.fulgidus – *Archaeoglobus fulgidus*

Abs – Absorvância

AMP – Monofosfato de adenosina (do inglês *Adenosine MonoPhosphate*)

ANAMMOX – Oxidação anaeróbia do ião amônia do inglês *ANaerobic AMMonium Oxidation*)

APS – Fosfosulfato de adenosina (do inglês *Adenosine PhosphoSulfate*)

aq – Aquoso

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês *Adenosine Triphosphate*)

BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato

BSA – Albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

C – Citosina

CaSO₄ – Sulfato de cálcio

Cd²⁺ – Ião cádmio

CBB – Azul brilhante de coomassie (do inglês *Coomassie Brilliant Blue*)

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico complementar (do inglês *Complementary DeoxyriboNucleic Acid*)

CHAPS – 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (do inglês 3-[(3-*cholamidopropyl*)*dimethylammonio*-1-*propanesulfonate*)

Fe – Ferro

FeS₂ – Pirite

FAD – Dinucleotido de flavina e adenina (do inglês *Flavin Adenine Dinucleotide*)

D. desulfuricans – *Desulfovibrio desulfuricans*

D. vulgaris – *Desulfovibrio vulgaris*

D. gigas – *Desulfovibrio gigas*

DNA – Ácido DesoxirriboNucleico (do inglês *DeoxyriboNucleic Acid*)

DNase I – Desoxirribonuclease I (do inglês *DeoxyriboNuclease I*)

DNRA – Redução dissimilativa do nitrato a ião amónia (do inglês *Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium*)

D.O. – Densidade Ótica

dSirs – Redutases dissimilativas de sulfito (do inglês *Dissimilatory Sulfite Redutases*)

DTT – Ditionitreitol (do inglês *Dithitritol*)

E.coli – *Escherichia coli*

EM – Micrografia eletrónica (do inglês *Electron Micrograph*)

G – Guanina

H₂S – Sulfureto de hidrogénio

HCl – Ácido clorídrico (do inglês *Chloridric Acid*)

Hdr – Redutases de heterodisulfureto

IEF – Focagem isoeétrica (do inglês *Isoelectric Focusing*)

IPG – Gradientes de pH imobilizados (do inglês *Immobilized pH Gradient*)

k_{cat} – Número de turnover

K_M – Constante de Michaelis-Menten

kDa – kiloDalton

I – Líquido

μ – Taxa específica de crescimento

Mg²⁺ – Ião magnésio

MGD – dinucleótido de molibdopterina e guanina (do inglês *Molybdopterin Guanine Dinucleotide*)

MO – Molibdénio

M_r – Massa molecular relativa

MS – Espectrometria de massa (do inglês *Mass Spectrometry*)

MV – Viologénio de metilo (do inglês *Methyl Viologen*)

MW – Massa molecular (do inglês *Relative Molecular Weight*)

NH₄⁺ – Ião amónia

NO_3^- – Nitrato

nm – Nanómetro

NEDA – N - (1 - naftil) etilenoamino dihidroclorato (do inglês *n* - (1 - *naphthyl*) *ethylenediamine*)

NiR – Redutase do nitrito (do inglês *Nitrite Redutase*)

NRPs – Peptido não ribossomais (do inglês *NonRibossomal Peptides*)

NRPSs – Sintetases de péptido não ribossomais (do inglês *Non Ribossomal Peptide Synthetase*)

ox – Oxidado

OASIS – Sistema de identificação ortogonal de sítio ativo (do inglês *Orthogonal Active Site Identification System*)

OTU – Unidades taxonómicas operacionais (do inglês *Operation Taxonomic Units*)

P. chrisogenum – *Penicillium chrisogenum*

PCR – Reação em cadeia de polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PKs – Policetídeos (do inglês *PolyKetides*)

PKSs – Sintetases de policétidos (do inglês *PolyKetide Synthases*)

PP – Fosfopanteteína (do inglês *PhosPhopantetheine*)

PPi – Pirofosfato inorgânico

PrISM – Investigação proteómica de metabolismo secundário (do inglês *Proteomic Investigation of Secondary Metabolism*)

PSA – PerSulfato de Amónia

Red – reduzido

RNA – Ácido RiboNucleico (do inglês *RiboNucleic Acid*)

RNase I – RiboNuclease I

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossomal (do inglês *ribossomal RiboNucleic Acid*)

S. arenicola – *Salinispora arenicola*

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

S. deleyianum – *Sulfurospirillum deleyianum*

S. pacifica – *Salinispora pacifica*

S – Enxofre

SO_4^{2-} – Sulfato

SO_3^{2-} – Sulfito

SA – SulfoAnilamida

SDS – N-dodecil-sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate*)

SEM – Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês *Scanning Eletron Microscopy*)

TEMED – Tetrametietilediamina (do inglês *TEtraMethylEthyeneDiamine*)

Td – Tempo de duplicação

U – Unidade de atividade enzimática

v – Volume

W. succinogenes – *Wolinella succinogene*

Capítulo 1 – Introdução

1 Introdução

1.1 Bactérias Redutoras de Sulfato

1.1.1 Ciclo do Enxofre

O enxofre é um dos elementos mais abundantes no planeta Terra, encontrando-se presente principalmente como pirite (FeS_2) ou sulfato de cálcio (CaSO_4) em rochas e sedimentos, e na forma de sulfato em água do mar¹. O ciclo do enxofre (Figura 1.1) é complexo, uma vez que este elemento possui uma ampla gama de estados de oxidação variando de - 2, na forma de sulfureto (completamente reduzido) a + 6, na forma de sulfato (completamente oxidado). Este ciclo pode-se dividir em duas partes: a via assimilativa e via dissimilativa.^{1,2} A primeira inclui assimilação de sulfureto e sulfato, assim como a libertação de enxofre, enquanto a via dissimilativa inclui processos oxidativos (oxidação de enxofre) e processos redutores, tais como redução do enxofre e sulfato.²

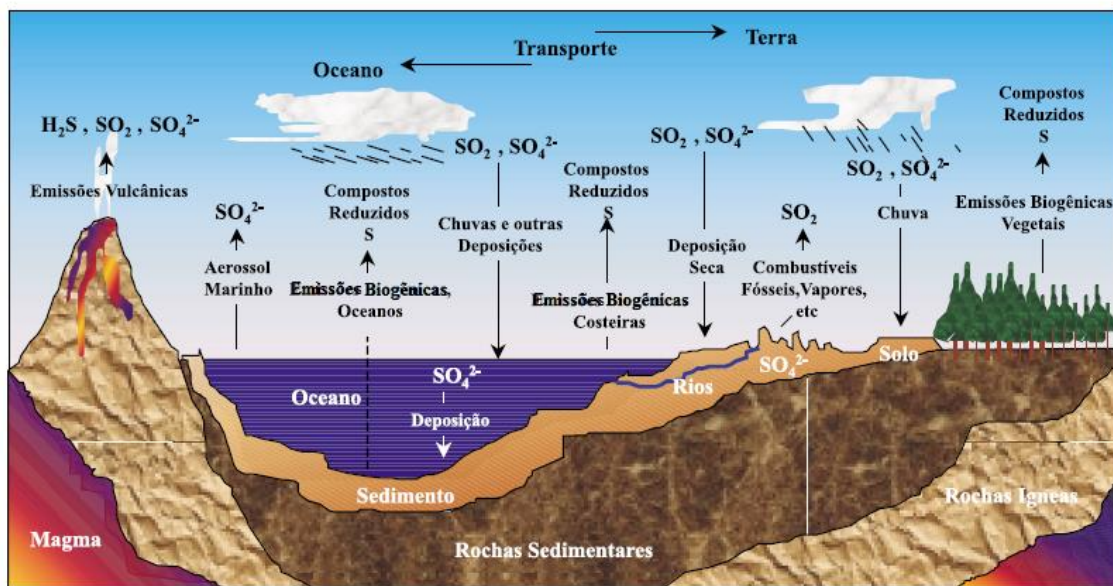


Figura 1.1: Ciclo biogeoquímico do enxofre.³

1.1.1.1 Redução Dissimilativa do Sulfato

O sulfato (SO_4^{2-}) é um composto quimicamente inerte, não volátil e não tóxico, encontrado normalmente difundido em rochas, solos e águas.⁴ Pode ser reduzido por duas vias distintas: a assimilativa e a dissimilativa. Na via dissimilativa, o sulfato é o aceitador terminal de elétrons da cadeia respiratória de um certo tipo de bactérias – as bactérias redutoras de sulfato (BRS), as quais investem uma molécula de trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate* - ATP) para ativar o sulfato através de uma sulfúrilase de ATP produzindo fosfosulfato de adenosina (*adenosine phosphosulphate*, APS) e pirofosfato inorgânico (PPi). Após a ativação, o APS é reduzido pela redutase do APS para formar sulfito (SO_3^{2-}) e monofosfato de adenosina (*adenosine monophosphate*, AMP). O SO_3^{2-} é então reduzido a sulfureto de hidrogénio (H_2S) por uma redutase dissimilativa de sulfito, transformação que pode acontecer por duas vias: redução direta do sulfito a sulfureto e via tritionato.^{5,6}

Na redução direta de sulfito a sulfureto, modelo formalizado por Rees em 1973, o passo principal é a redução de 6 e^- do sulfito a sulfureto, numa reação catalisada por uma redutase dissimilativa do sulfito. Em 2005, Brunner & Bernasconi, propuseram a via do tritionato, na qual tanto o tritionato como o tiossulfato são intermediários na redução do sulfito a sulfureto. Nesta via, a redutase dissimilativa do sulfito reduz o sulfito a tritionato seguida da ação de uma redutase de tritionato que catalisa o segundo passo desta via, reduzindo tritionato a tiossulfato, e por fim, o tiossulfato é reduzido a sulfureto por uma redutase de tiossulfato. No total, o processo de redução dissimilativa do sulfato envolve uma transferência de 8 elétrons para reduzir o SO_4^{2-} a H_2S , tanto numa via como na outra (Figura 1.2).⁶

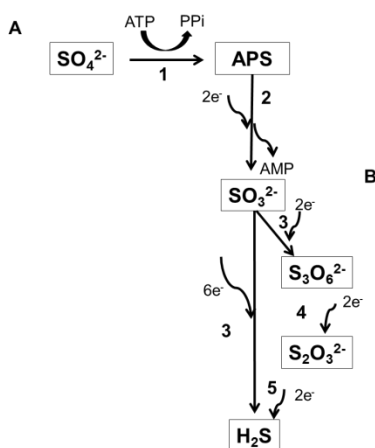
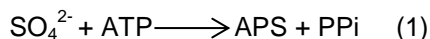


Figura 1.2: Redução dissimilativa do sulfato pela via direta (A) e pela via do tritionato (B). 1 – sulfúrilase de ATP; 2 – redutase do APS; 3 – redutase dissimilativa do sulfito; 4 – redutase do tritionato e 5 – redutase do tiossulfato. [adaptado de 6]

A redução dissimilativa do sulfato é realizada por vários gêneros de bactérias redutoras de sulfato como processo respiratório, uma vez que se encontra associada à fosforilação oxidativa. Inúmeros estudos foram realizados de forma a compreender a transferência de elétrons na cadeia respiratória destes organismos, e foi proposto que a conservação de energia é realizada por complexos membranares de transporte de elétrons, nomeadamente os complexos QmoABC e DsrMKJOP, cujas subunidades de cada encontram-se relacionadas com as redutases de heterodisulfureto (Hdr) de organismos metanogénicos, sendo também capazes de interatuar com as quinonas.^{7,8}

1.1.1.1.1 Sulfurilase de ATP

A sulfurilase de ATP é uma enzima que catalisa o primeiro passo tanto da via assimilativa como da dissimilativa do sulfato.⁹ No primeiro caso, esta enzima catalisa a seguinte reação (eq.1):¹⁰



As sulfurilases de ATP encontram-se amplamente distribuídas na Natureza e têm sido isoladas em vários tipos de organismos, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrisogenum*, *Penicillium duponti*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio gigas*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio africanus*, *Desulfovibrio salexigens*, *Desulfotomaculum orientis* *Desulfotomaculum ruminis*, entre outros (Figura 1.3).¹⁰

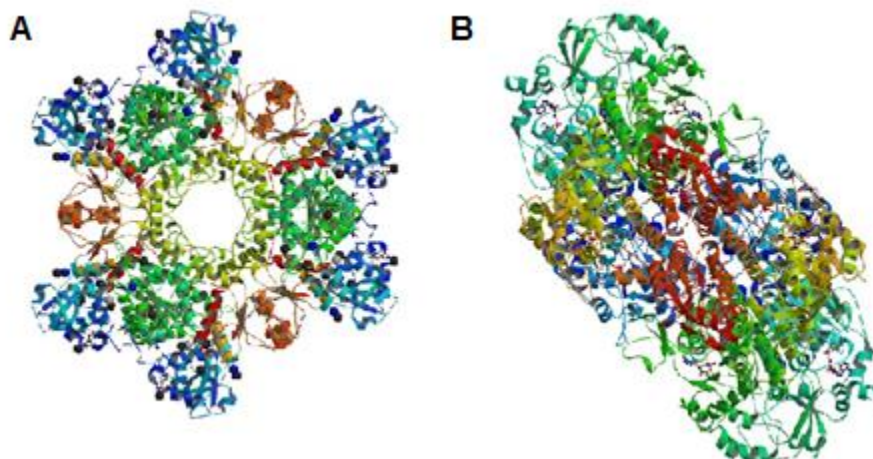
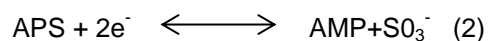


Figura 1.3: Estruturas cristalinas da sulfúrilase de ATP de (A) *S. cerevisiae* (codificado pelo gene *MET3*), (código de PDB:1G8F) que contém como cofatores o íon magnésio (Mg^{2+}) e o íon cádmio (Cd^{2+}) e de (B) *P. chrisogenum* (código de PDB:1I2D).¹¹

1.1.1.1.2 Redutase do APS

A redutase do APS é uma enzima citoplasmática codificada pelo operão *aprBA* que catalisa o segundo passo da redução dissimilativa do sulfato, reduzindo o APS a sulfito e adenosina monofosfato (eq.2):^{12,13}



Esta enzima, descoberta por Peck, Ishimoto e Fujimoto em 1961 contém um complexo heterodimérico composto por uma subunidade α (70 - 75 kDa) contendo uma molécula de dinucleótido de flavina (*Flavin Adenine Dinucleotide* - FAD) e uma subunidade β (18 - 23 kDa com dois centros de ferro-enzofre ([4Fe-4S]), encontrando-se presente numa variedade de géneros de bactérias redutora de sulfato (Figura 1.4).^{2,14,15}

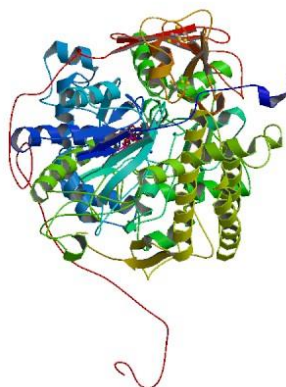
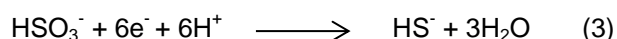


Figura 1.4: Estrutura da redutase de APS em *D. gigas* contendo uma molécula de FAD e dois centros de ferro-enxofre [4Fe-4S] como cofatores (código de PDB:3GYX).

Diversos tipos de bactérias oxidantes de enxofre, nomeadamente fototróficas, quimiotróficas e anaeróbias facultativas possuem proteínas homólogas à redutase do APS que catalisam a oxidação do sulfureto a sulfato.¹⁴

1.1.1.1.3 Redutase Dissimilativa do Sulfito

A redutase dissimilativa do sulfito, proteína codificada pelo operão *dsr*, catalisa a redução de seis elétrons do sulfito a sulfureto que corresponde à última reação da via de redução dissimilativa do sulfato (eq. 3):⁷



Esta proteína encontra-se em vários organismos, como por exemplo, *Archaeoglobus fulgidus*, *D. desulfuricans*, *D. vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pyrobaculum aerophilum* (Figura 1.5).¹⁶

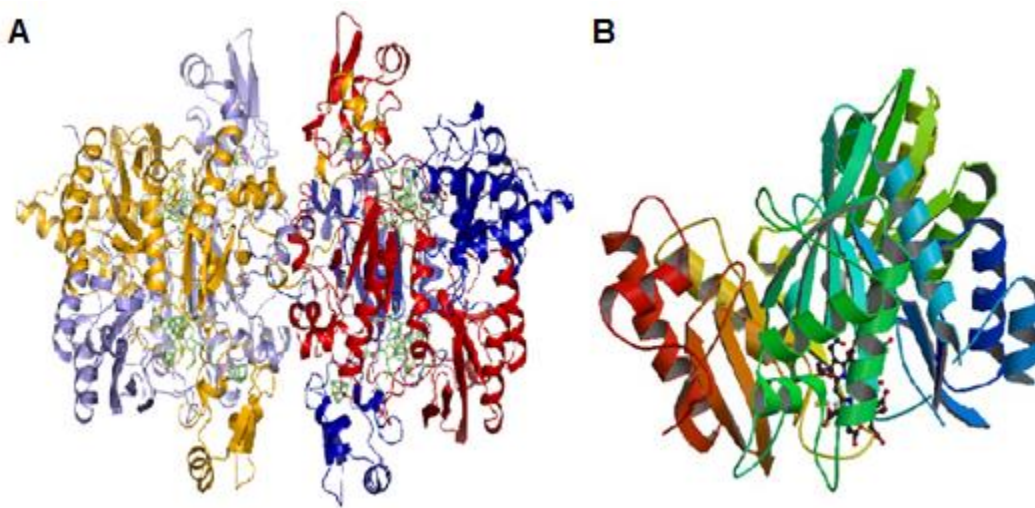


Figura 1.5: Estrutura da redutase de sulfito de (A) *A. fulgidus* e (B) *E. coli* (código de PDB:1AOP). Ambas as redutases contêm centros de ferro-enzofre [4Fe-4S] e um sirohemo como cofatores.¹⁶

As redutases dissimilativas de sulfito (dSiRs) estudadas até à data são compostas por um complexo heterotetramérico ($\alpha_2\beta_2$) e, dependendo dos organismos em que se encontram, podem conter também duas subunidades pequenas adicionais, γ e δ , resultando num complexo multimérico $(\alpha\beta)_2\gamma_n\delta_m$. As subunidades α , β , γ e δ possuem massas moleculares de aproximadamente 45, 43, 10 e 11 kDa, respetivamente.¹⁶ Estudos realizados nos diferentes organismos anteriormente referidos levaram a algumas conclusões acerca das funções das diferentes subunidades presentes na estrutura destas enzimas. Sendo assim, a atividade catalítica destas enzimas localiza-se no núcleo do complexo $(\alpha\beta)_2$; a subunidade γ contém uma ligação dissulfureto que pode funcionar na transferência de elétrons para um dador de elétrons externo

ainda não identificado. Por fim, a subunidade δ é caracterizada por um motivo hélice-*winged* o que sugere que esta possa possuir um papel na ligação do DNA e regulação.¹⁶

1.1.1.1.4 Complexos QmoABC e DsrMKJOP

As proteínas do complexo QmoABC são codificadas pelo operão *qmoABC*, genes que se encontram presentes em bactérias oxidantes de enxofre, tais como, *Chlorobium tepidum*, *Chlorobium chlorochromati*, *Thiobacillus denitrificans*. Este complexo é constituído por 3 subunidades: uma membrana (QmoC) que contém dois citocromos do tipo b, e duas citoplasmáticas (QmoAB) e bem como duas moléculas de FAD e vários centros de ferro-enxofre. Este complexo foi isolado pela primeira vez em 2003, a partir de membranas de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774.^{7,8}

O complexo DsrMKJOP, isolado primeiramente em 2002 a partir de *A. fulgidus* e em 2006 a partir de *D. desulfuricans* ATCC 27774 é codificado pelo operão *dsrMKJOP*. É constituído por subunidades de transferência eletrónica encontradas: (i) na membrana, como a subunidade QmoM que contém seis hélices transmembranares e quatro histidinas e a subunidade DsrP que possui dez hélices transmembranares; (ii) no citoplasma, como a subunidades DsrK que é constituída por um dos cinco motivos de cisteína envolvido na ligação ao centro catalítico [4Fe-4S], e (iii) no periplasma, como as subunidades QmoJ que é um citocromo tri-hémico do tipo c e DsrO que é uma proteína de ferro-enxofre e pertence à família das ferredoxinas encontradas em várias enzimas respiratórias.^{7,17}

1.1.2 Ciclo do Azoto

O ciclo do azoto tem vindo ao longo dos anos a receber muita atenção devido à sua enorme importância, por exemplo na agricultura e nos processos de tratamento de águas.¹⁸ O azoto é um elemento básico para a vida, uma vez que é um componente essencial de biomoléculas, tais como aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. Interconversões destas espécies de azoto constituem o ciclo de azoto global que é sustentado por processos biológicos, nos quais as bactérias possuem um papel importante. O ciclo de azoto envolve no total seis reações de oxidação/redução em que o azoto passa da forma mais oxidada (NO_3^- , +5) para a sua forma mais reduzida (NH_4^+ , -3): i) fixação do azoto; ii) redução assimilativa do nitrato; iii) nitrificação; iv) desnitrificação; v) redução dissimilativa de nitrato a ião amónia e vi) oxidação anaeróbia do ião amónia (ANAMMOX, abreviação do inglês **ANaerobic AMMonium OXidation**) (Figura 1.6).¹⁹

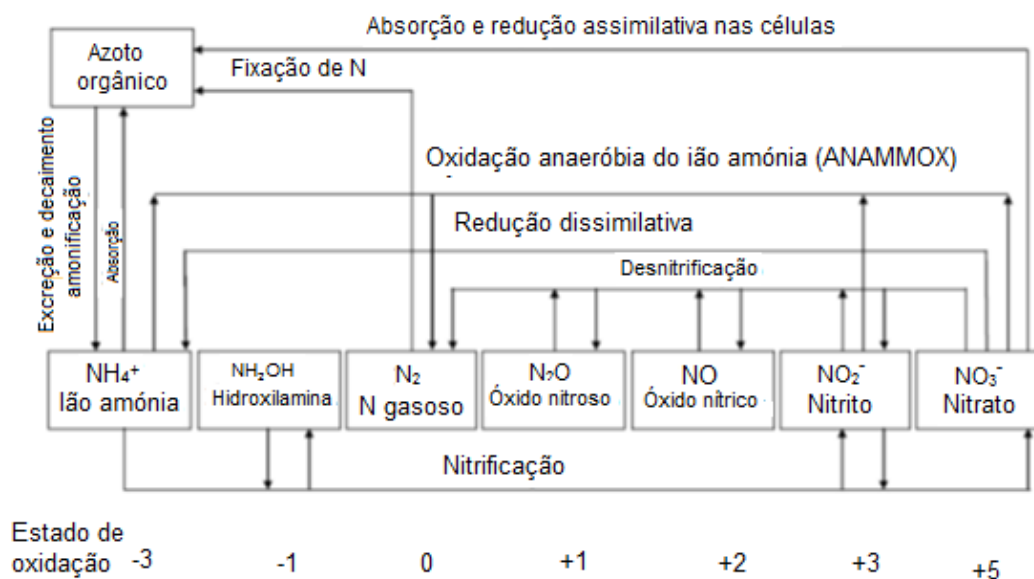


Figura 1.6: Ciclo biogeoquímico do azoto.²⁰

1.1.2.1 Redução Dissimilativa do Nitrato a Ião Amónia

O nitrato é um dos componentes essenciais no ambiente e na biosfera. Serve como nutriente para as plantas e micro-organismos, e é usado como aceitador de eletrões por muitas bactérias, arqueobactérias e também por diversos eucariotas.²¹

A redução dissimilativa do nitrato a ião amónia, (DNRA, acrónimo em inglês que significa *Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium*) é um processo que ocorre quando o nitrato é limitante em comparação com o carbono orgânico. Neste processo, o nitrato é reduzido a ião amónia em dois passos consecutivos. O primeiro, corresponde à redução do nitrato a nitrito que é catalisada pelo complexo enzimático redutase do nitrato periplasmática NapAB. O segundo passo corresponde à redução total do nitrito a ião amónia, reação catalisada pelo citocromo c redutase do nitrito, uma proteína associada à membrana periplasmática tal como ilustrado na Figura 1.7.²¹

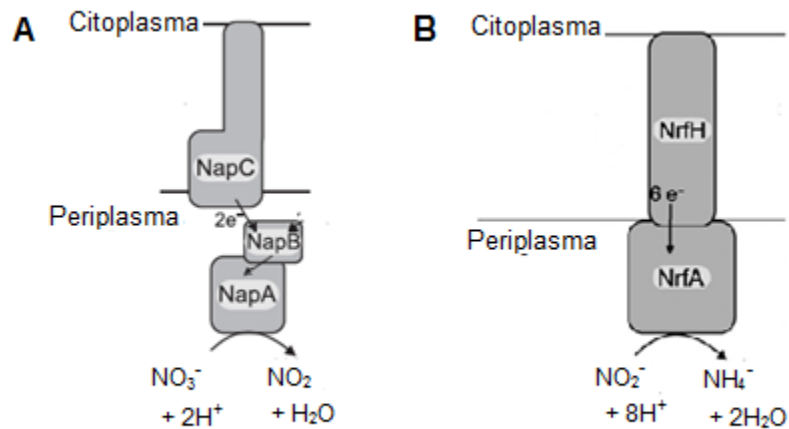
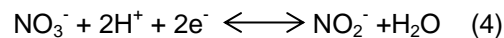


Figura 1.7: Enzimas envolvidas no DNRA: (A) redutase do nitrato periplasmática (NapAB) e (B) complexo NrfHA.²¹

1.1.2.2 Redutase do Nitrato - Nap

Tal como referido anteriormente, a redutase do nitrato Nap, codificada pelo operão *nap*, é uma enzima periplasmática que catalisa a primeira reação da DNRA representada pela seguinte equação (eq.4):^{22,23}



Esta enzima foi primeiramente identificada em bactérias fototróficas e desnitrificantes, mas são mais comuns em bactérias Gram-negativas. A sua atividade parece não estar diretamente envolvida na assimilação do nitrato ou na respiração anaeróbia, embora o nitrito gerado por esta enzima possa ser usado como fonte de azoto ou como substrato para respiração anaeróbica dependendo do organismo.²⁴ Os sistemas da Nap foram estudados a nível bioquímico e genético numa variedade de organismos, tais como *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*), *Thiosphaera pantotropha* (*Parococcus denitrificans*), *E. coli*, e algumas espécies de *Rhodobacter* (Figura 1.8). Relativamente à sua estrutura, a redutase do nitrato é um heterodímero contendo uma subunidade catalítica (NapA), codificada pelo gene *napA*. Tem uma massa molecular de 90 kD, um cofator de molibdénio e um centro de ferro enxofre [4Fe-4S] no N-terminal e um citocromo c bihémico de 15 kDa (NapB), codificado pelo gene *napB*, que recebe eletrões de um citocromo c tetrahémico de 25 kDa ligado à membrana (NapC).^{24,25}

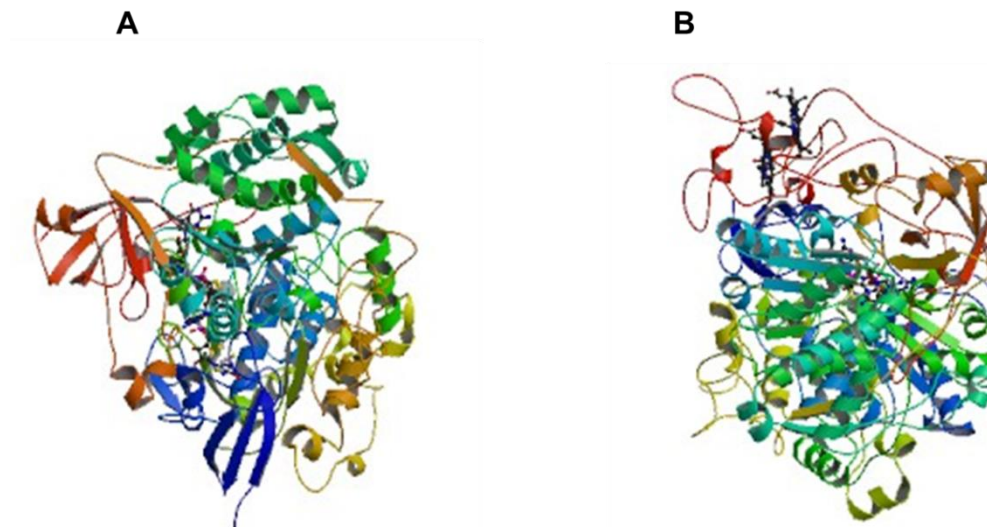
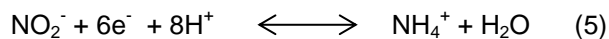


Figura 1.8: Estrutura da redutase de nitrato de (A) *E. coli* (código de PDB:2NYA) e (B) *Rhodobacter Sphaeroides*.

1.1.2.3 Redutase do Nitrito - NiR

A redutase do nitrito, NiR, catalisa a redução de seis elétrons de nitrito a íon amónia, sendo o último passo enzimático da redução dissimilativa de nitrato a amónia. (eq. 5)²⁶



A presença desta proteína foi reportada em vários organismos, incluindo *E. coli*, *Vibrio fischeri*, *D. desulfuricans* ATCC 27774, *D. vulgaris*, *Campylobacter sputorum*, *Wolinella succinogenes*, *Sulfurospirillum deleyianum*, *Geobacter metallireducens* (Figura 1.9).^{27,28}

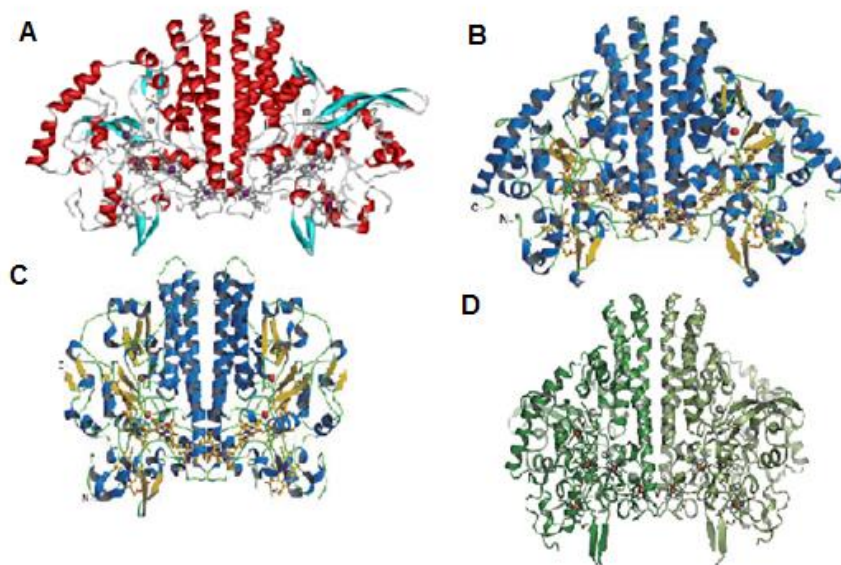


Figura 1.9: Estrutura da redutase do nitrito de (A) *S. deleyianum* (código de PDB: 1QDB) (B) *E. coli* (C) *D. desulfuricans* e (D) *W. succinogenes* e seus respectivos cofatores (hemos do tipo *c*).^{29,30}

A redutase do nitrito é uma proteína com 55 - 65 kDa que liga cinco grupos hemo do tipo *c* através de ligações às cisteínas num motivo conservado (CXXCK). Quatro destes grupos hemos são considerados centros de transferência de elétrons com dois resíduos de histidina como ligandos axiais, enquanto o outro é considerado como o hemo catalítico, em que uma posição de coordenação do ferro encontra-se livre para acomodar o substrato.²⁹

1.1.3 Gênero *Desulfovibrio*

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) possuem um metabolismo bastante versátil, uma vez que utilizam uma variedade de doadores de elétrons (hidrogênio, lactato, formato, piruvato, álcoois) e aceptores (enxofre elementar, sulfato, sulfito, nitrato, nitrito).^{31–33} o que lhes permite adaptar facilmente a mudanças ambientais e habitar em uma grande variedade de locais. Os mecanismos moleculares responsáveis por tal versatilidade, que estarão relacionadas com expressão de proteínas necessárias ao crescimento celular em diferentes condições ambientais, ainda se encontram pouco explorados.

São seres procariontes que podem apresentar forma de células esféricas, ovóides, bastonetes ou vibróides, com diâmetro em torno de 0,3 a 0,4 μm . Com base em análises comparativas das sequências de 16S rRNA, as BRS podem ser agrupadas em sete subdivisões: cinco pertencentes ao domínio *Bacteria* (*Deltaproteobacteria*, *Nitrospirae*, *Clostridia*,

Thermodesulfobiaceae e *Thermodesulfobacteria*) e dois pertencentes ao domínio *Archaea* (*Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*) (Figura 1.10).^{1,2,34}

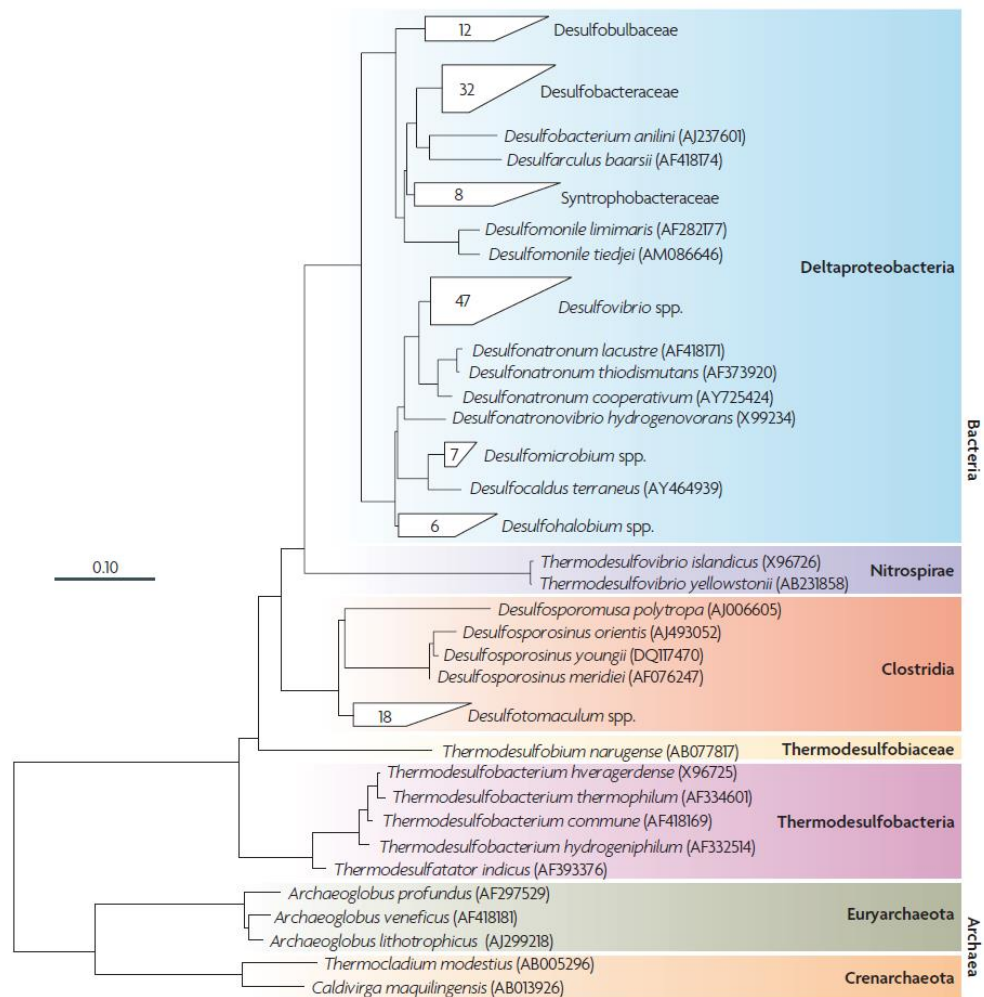


Figura 1.10: Árvore filogenética de bactérias redutoras de sulfato baseada nas sequências de 16S rRNA.¹

Podem ser encontrados em diversos ambientes naturais e artificiais onde o sulfato se encontra presente. As BRS foram identificadas ou isoladas a partir de sedimentos marinhos, fontes hidrotermais, vulcões, entre outros. Foram detetadas igualmente em *habitats* com valores de pH extremos, desde 2 a 10, em campos de petróleo, sedimentos de água doce, na rizoesfera das plantas e em sistemas artificiais, como por exemplo tratamento de plantas com águas residuais.¹ Podem também ser encontrados perto de *habitats* óxicos, uma vez que têm as proteínas que lhes permitem sustentar a uma exposição prolongada de oxigénio.^{35,36} Assim sendo, podem crescer em áreas onde a disponibilidade de nutrientes é mais elevada.

Este tipo de bactérias possui um enorme impacto ambiental, industrial e económico e ainda a nível da saúde humana. A nível ambiental, uma vez que desempenham um papel essencial no ciclo do enxofre e regulam vários processos ambientais, tais como, biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos clorados em ambientes anaeróbios, metilação de mercúrio, entre outros.³⁷ A nível industrial, estes microrganismos encontram-se presentes em processos envolvidos no tratamento de águas e esgotos municipais e industriais.³⁸ Para além disso, são bastante utilizados em biorremediação, uma vez que são capazes de reduzir vários metais tóxicos possuindo um papel benéfico em matéria da poluição ambiental da saúde pública.³⁹ Ao nível económico, são um enorme problema na indústria petrolífera, devido à produção de sulfuretos que em elevadas concentrações leva à corrosão das instalações.^{1,40} Por fim, a nível da saúde humana, as BRS têm sido cada vez mais associadas a uma variedade de patologias humanas, como por exemplo, a periodontite, a colite ulcerosa, a bacteremia e doenças infecciosas crónicas atuando diretamente em infeções ou tendo o papel de oportunistas.⁴¹

Dentro das bactérias redutoras de sulfato, o género melhor estudado é o *Desulfovibrio*. As espécies pertencentes a este género possuem características particulares e similares entre elas. São vibrios Gram-negativas; não possuem esporos; são anaeróbios; são mesofílicas e algumas vezes halofílicas; contêm citocromos c3 e um pigmento denominado de desulfovirdina, que a pH alcalino se torna vermelho e a pH ácido azul-verde; são redutoras de sulfato facultativas ou obrigatórias. Estas bactérias podem ser encontradas tanto no meio ambiente, como solos, água, esgoto, como também no trato digestivo de animais e seres humanos. Em escala laboratorial, as culturas de *Desulfovibrio* normalmente mostram crescimento linear. Este tipo de crescimento pode ocorrer devido a três razões principais: (i) uma acumulação de sulfureto nas culturas durante o crescimento atuando como um inibidor; (ii) precipitação do ferro, que é necessário como micronutriente pelo sulfureto diminuindo a sua disponibilidade; (iii) evaporação do sulfureto durante o crescimento diminuindo o valor de pH da cultura. Esta mudança de pH altera tanto a taxa de crescimento como a de rendimento.^{33,42}

1.1.3.1 *Desulfovibrio Desulfuricans* ATCC 2774

A espécie *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 2774 pertence a um dos géneros das bactérias redutoras de sulfato, mais propriamente à classe das *Deltaproteobacteria*. Este organismo, isolado originalmente a partir do rúmen de ovelha, possui uma forma *bacillus* (em forma de haste) com presença de flagelos e sem esporos (Figura 1.11) e pode ser encontrado em inúmeros *habitats* (água do mar, água doce, solos e trato intestinal de animais). Cresce anaerobiamente e utiliza uma variedade de aceitadores de eletrões, tais como sulfato, enxofre, nitrato, nitrito, entre outros. (<http://bacmap.wishartlab.com/organisms/818> (acedido a 21/11/2013)).

O seu genoma é conhecido e contém um total de 2873437 nucleótidos dos quais cerca de 2356 genes codificam proteínas (dado fornecido por: <http://www.genome.jp/kegg.html>)

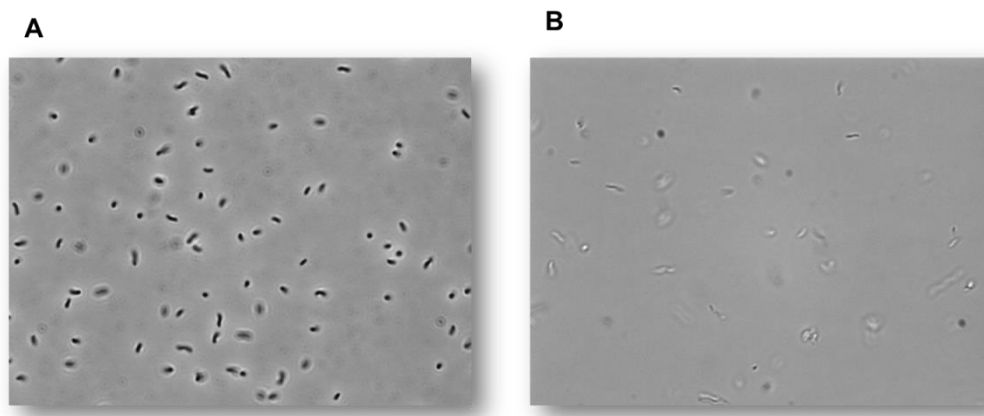


Figura 1.11: Fotos representativas das células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 crescidas em meio contendo nitrato (A) e em meio contendo sulfato (B) obtidas por microscopia eletrônica (ampliação 1000x).

1.1.3.1.1 Aceitadores Finais de Eletrões: Nitrato vs Sulfato

Estudos prévios em *D. desulfuricans* ATCC 27774 indicam que as enzimas envolvidas na redução dissimilativa de sulfato são expressas em igual nível se as células forem cultivadas em sulfato ou nitrato, enquanto as enzimas envolvidas na redução dissimilativa de nitrato a amônia são induzíveis e as suas atividades são consideravelmente mais elevadas em células cultivadas em nitrato do que em sulfato.⁴³ Segundo Silva *et al.*, este organismo prefere reduzir sulfato quando na presença de nitrato e sulfato, ainda que a redução do nitrato seja mais favorável do ponto de vista termodinâmico. Estudos recentes revelam que a expressão da redutase do nitrato Nap é induzida por nitrato mas é reprimida se sulfato estiver presente mesmo em quantidades limitadas.⁴⁴

Algumas das proteínas envolvidas nos mecanismos de adaptação de *D. desulfuricans* crescer em nitrato e sulfato são: a sulfurilase de ATP, a redutase do APS, a redutase dissimilativa do nitrito e as redutases do nitrato e do nitrito.

A sulfurilase de ATP de *D. desulfuricans* ATCC 27774 é um homotrímero, com monómeros de peso molecular de 47 kDa com 423 resíduos de aminoácidos.⁴⁵ A redutase do APS desta bactéria é citoplasmática e é semelhante à enzima de *Archaeoglobus fulgidus*, que é um heterodímero α/β de massa molecular 95 kDa, em que a subunidade α (75 kDa) possui uma molécula de FAD ligada não covalentemente e a subunidade β (20 kDa) contém dois centros de ferro-enxofre [4Fe-4S].⁴⁶ Em relação à redutase dissimilativa do sulfato, é um hexâmero constituído por 3 subunidades ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), em que as subunidades α (49 kDa) e β (43 kDa) são codificadas pelos

genes *dsrA* e *dsrB*, respectivamente. Esta enzima contém 24 ± 3 átomos de ferro e 18 ± 3 íons de sulfureto por hexâmero.⁴⁷

Relativamente à redutase do nitrato periplasmática (Nap), cuja estrutura foi publicada por Dias et al. em 1999, é uma proteína monomérica de forma elipsoidal e de massa molecular de aproximadamente 80 kDa. A sua estrutura encontra-se enrolada em quatro domínios com uma topologia do tipo α/β em que todos os domínios estão envolvidos na ligação ao cofator MGD (*molybdopterin guanine dinucleotide*). O centro ativo/catalítico desta proteína é constituído por um íon de molibdénio (Mo) hexa-coordenado a dois cofatores MGD, a um grupo hidroxilo de uma molécula de água e a uma cisteína (Cys140). Além disso, a enzima possui um centro de ferro-enxofre [4Fe-4S], que estará envolvido na transferência de eletrões (Figura 1.12).^{12,48}

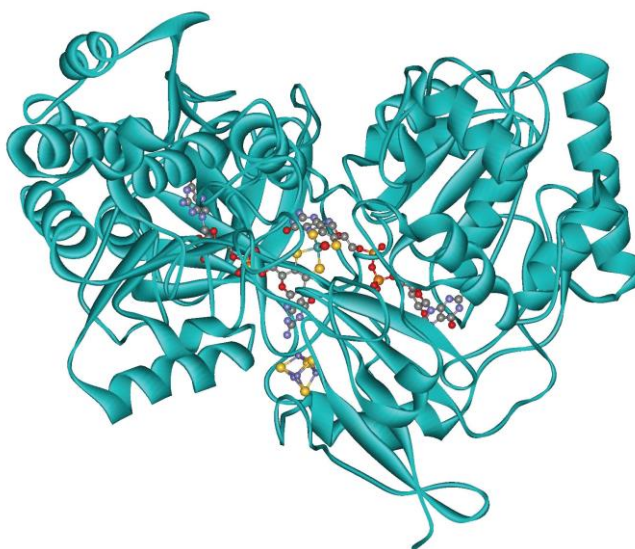


Figura 1.12: Estrutura tri-dimensional de Nap de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 com Mo-bisMGD e um centro de ferro-enxofre [4Fe-4S] como cofatores.²²

Por fim, a redutase do nitrito (NiR) do *D. desulfuricans* ATCC 2774 é um complexo multihémico composto por duas subunidades, NrfA de 61 kDa e NrfH de 19 kDa numa proporção estequiométrica de 2:1. Ambas as subunidades contêm hemos do tipo c e são codificadas pelos genes *nrfA* e *nrfH*, respectivamente.³⁰ A subunidade NrfA contém cinco hemos do tipo c e é um dímero cuja estrutura é dominada pelo feixe de três hélices (h21, h22, h23) na região da interface do dímero (Figura 1.13).⁴⁹ Os hemos 2 a 5, de acordo com a ordem dos seus motivos de ligação na sequência, têm coordenadas bis-histidinil e são utilizados pela enzima para armazenar e transferir eletrões para o centro catalítico, o hemo 1, que por sua vez é coordenado por uma cadeia lateral de lisina na extremidade proximal lateral, enquanto que a posição de coordenação distal do ferro encontra-se vazio. Existe um segundo íon cálcio (CaII), para além do íon cálcio (CaI), normalmente encontrado neste tipo de proteínas que possui coordenação octaédrica aos ligandos das proteínas

perto dos propionatos dos hemos 3 e 4.⁴⁹ A subunidade NrfH é uma proteína tetrahémica transmembranar envolvida na transferência de elétrons a partir da membrana citoplasmática para NrfA. A análise da sua sequência revela que esta proteína possui dois domínios: um solúvel compreendendo três hemos do tipo c da classe III (hemos 2 a 4) e um domínio hidrofóbico inserido na membrana citoplasmática com um quarto hemo (hemo 1).³⁰

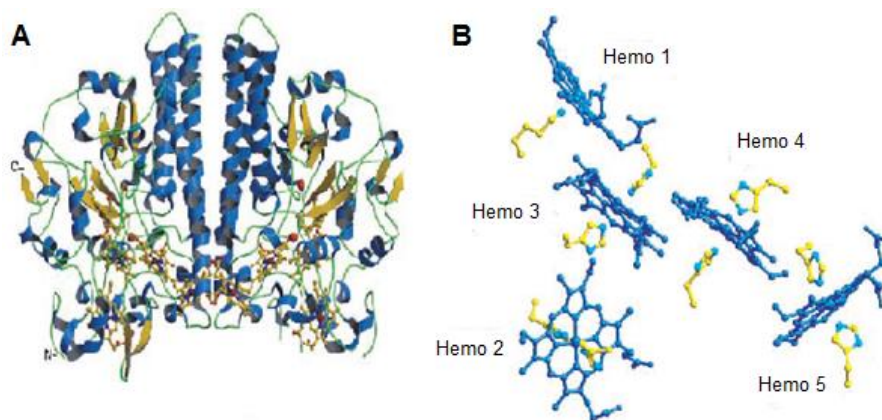


Figura 1.13: Redutase dissimiliativa do nitrito (NiR). (A) Estrutura de NrfA (B) arranjo espacial relativo dos grupos hemos *D.desulfuricans* ATCC 27774.^{30,49}

De seguida, nas Figuras 1.14 e 1.15 estão representados os mapas metabólicos do azoto e do enxofre de *D. desulfuricans*, tendo sido assinaladas as enzimas referidas anteriormente.

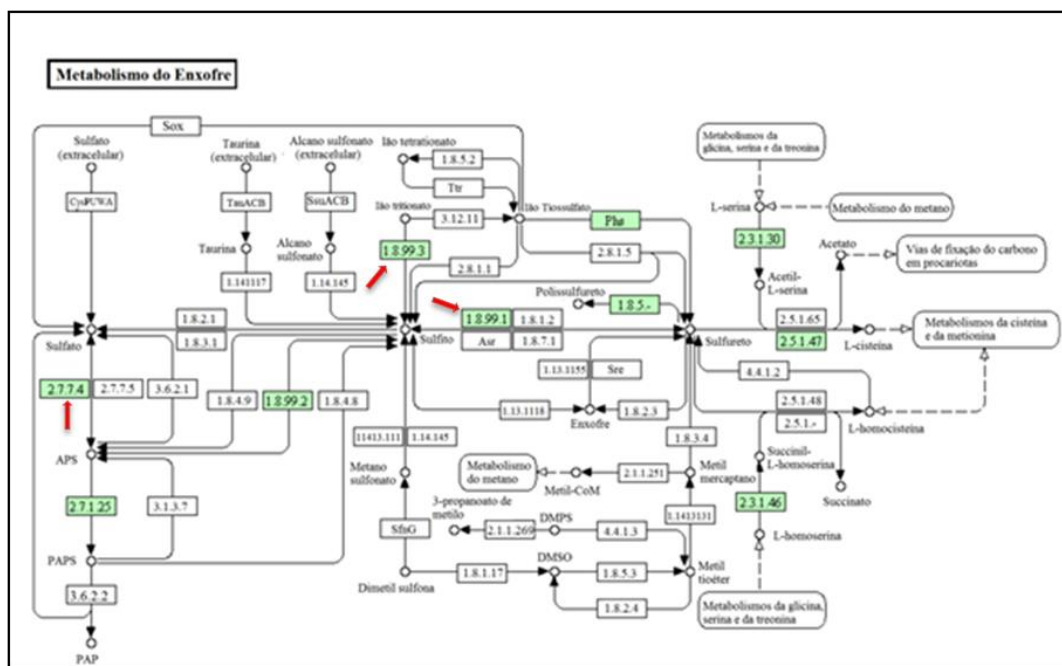


Figura 1.14: Metabolismo do enxofre realizado por *D. desulfuricans* ATCC 27774 [adaptado de <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>]. As principais enzimas envolvidas na redução dissimilativa do sulfato encontram-se indicadas com setas vermelhas. 2.7.7.4 – redutase do APS; 1.8.99.1 – redutase dissimilativa do sulfato.

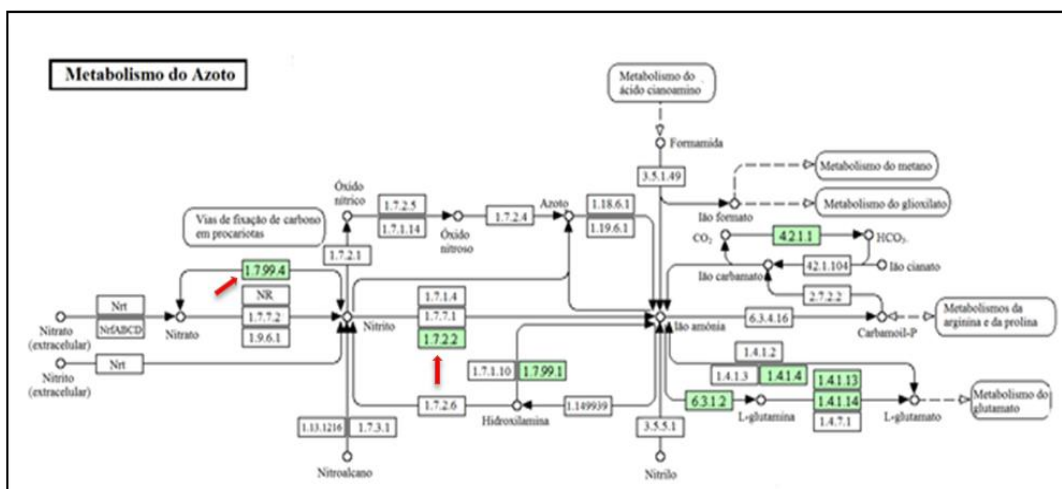


Figura 1.15: Metabolismo do azoto realizado por *D. desulfuricans* ATCC 27774 [adaptado de: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>]. As principais enzimas envolvidas na redução dissimilativa do nitrato encontram-se indicadas com setas vermelhas. 1.7.99.4 – redutase do nitrato; 1.7.2.2 – redutase do nitrito.

1.1.4 Estudos de Proteômica

Após os avanços e os alcances da genómica, o estudo das proteínas codificadas pelo genoma, denominado Proteómica, era o passo mais lógico para a compreensão de aspetos funcionais de frações celulares ou tecidos. Ao contrário do genoma, o proteoma é bastante dinâmico e pode mudar em resposta a fatores celulares ou ambientais. Para além disso, o proteoma é mais complexo que o genoma devido a processos como o *splicing*, eventos pós-tradução a nível proteico, modificações pós tradução, degradação de proteína, entre outros.⁵⁰ Torna-se claro então que hoje em dia a complexidade de um organismo não pode ser estudado apenas pela análise, mesmo que ao pormenor, da sequência do DNA.⁵¹

Os estudos proteómicos baseiam-se na análise simultânea das proteínas de amostras complexas, tais como frações celulares ou tecidos, envolvendo técnicas de separação, quantificação e identificação de uma variedade de proteínas provenientes de uma mesma amostra. Existem várias técnicas que podem ser utilizadas no estudo de um proteoma, sendo que a abordagem mais clássica é a eletroforese bidimensional (*two dimensional gel electrophoresis* - 2DE), descrita pela primeira vez em 1975 por O'Farrel.⁵¹ Embora o nome de eletroforese 2D sugira que é um processo de duas etapas, de facto é um processo de cinco etapas: 1) preparação da amostra; 2) primeira dimensão - focagem isoeletrica (*Isoelectric Focusing* – IEF); 3) interface com a segunda dimensão; 4) segunda dimensão – eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (*Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrilamide Gel Electrophoresis* - SDS-PAGE) e 5) deteção das proteínas.⁵²

A preparação da amostra é um dos passos importantes, uma vez que é crucial para obter resultados quantitativos e reprodutíveis. Este passo tem como objetivo a extração e solubilização de todas as proteínas da amostra e deve ser otimizado dependendo da complexidade desta. Para tal, são necessários a junção de tratamentos e métodos para tal efeito. Primeiramente, as células devem ser efetivamente lisadas, o que pode ser feito por métodos físicos e/ou químicos. De seguida, devem ser homogeneizadas com inibidor de proteases para ajudar a prevenir a degradação das proteínas, devido à libertação de proteases resultantes da lise, e se a amostra contiver níveis elevados de ácidos nucleicos, que podem ligar a proteínas por interações eletrostáticas impedindo a focagem das mesmas, assim como aumentar a viscosidade da amostra, esta deve ser tratada com endonucleases (DNase e RNase). Finalmente, a combinação de agentes caotrópicos, tais como a ureia e tiourea e detergentes neutros como o CHAPS são usualmente utilizados, de modo a desnaturar e solubilizar as proteínas sem alterar a carga das mesmas.^{52,53}

A focagem isoeletrica é uma técnica eletroforética que separa as proteínas de acordo com os seus pontos isoeletricos (pI). Este passo é realizado em *strips* com gradientes de pH imobilizados (*Immobilized pH gradient* - IPG) que quando se encontram sob a influência de um

campo elétrico, uma proteína migra até uma região em que o pH corresponderá ao seu pI, ou seja, onde a sua carga é nula. Como resultado, as proteínas ficam posicionadas no ponto do gel em que o pH corresponde ao seu pI.⁵³

Após a primeira dimensão, é então realizada uma eletroforese em condições desnaturantes. Contudo, é necessário efetuar um passo de equilíbrio das *strips*, em que as proteínas são reduzidas com ditioneitol (DTT), e posteriormente alquiladas com iodoacetamida nos grupos tiol das proteínas, para prevenir a sua reoxidação durante a eletroforese. A iodoacetamida também remove o excesso de DTT. De seguida é realizada então a eletroforese, onde as proteínas são separadas de acordo com a massa molecular relativa (M_r).⁵³

Para finalizar, é necessário visualizar as proteínas separadas no gel, e para tal, tem de se corar o gel. Existem vários tipos de coloração, sendo os mais comuns: coloração com nitrato de prata, coloração com azul de *coomassie* coloidal e marcação com sondas fluorescentes. As proteínas separadas aparecem no gel como pequenos pontos - *spots* - em que idealmente, cada *spot* corresponde a uma proteína.⁵¹ Este passo é importante devido a duas razões: 1) apenas o que é detetado é que pode ser analisado e 2) as variações quantitativas observadas nesta etapa são a base para selecionar alguns *spots* de interesse, em estudos comparativos, que irão ser apenas processados para posterior análise por espectroscopia de massa (*Mass Spectrometry*, MS)⁵²

1.1.4.1 Proteómica nas BRS

Existem vários relatos de estudos proteómicos em certas espécies de bactérias redutoras de sulfato, mais propriamente, na bactéria *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Por exemplo, em 2006 foi avaliado o efeito da exposição desta espécie a condições oxidativas por Fournier *et al.*³⁵ Outro grupo de cientistas estudou o efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento das células desta bactéria.⁵⁴ E ainda no mesmo ano, o efeito da exposição de *D.vulgaris* a nitrato foi observado por Redding *et al.*, o que levou à conclusão de que esta espécie em particular não tem capacidade de utilizar nitrato como substrato eletrónico.⁵⁵

1.1.5 Objetivos

No entanto, o estudo a via de transferência eletrônica do metabolismo respiratório da bactéria *D. desulfuricans* ATCC 27774 encontra-se ainda bastante incompleto. Assim sendo, nesta primeira parte do trabalho foi realizado um estudo proteômico recorrendo à técnica de eletroforese bidimensional para avaliar os perfis de expressão proteica de células de *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato ou sulfato. As alterações a nível proteico devem indicar as ferramentas moleculares que conferem a flexibilidade respiratória deste microrganismo. Assim, pretende-se compreender melhor os mecanismos de modulação que são ativados pelas células e que lhes conferem adaptação a diferentes ambientes.

1.2 Actinobactérias Marinhas

O oceano cobre mais de 70% da superfície da Terra, representando acima de 95% de toda a biosfera. No entanto, é o ambiente do planeta cujos recursos são menos explorados, especialmente no que se refere a microrganismos. Os oceanos profundos e os abismos com profundidades superiores a 2000 m foram considerados desertos biológicos, até um estudo realizado por Grassle e Maciolek em 1992, ter estimado uma diversidade microbiana superior a 10 milhões de espécies nestes *habitats*.⁵⁶⁻⁵⁸ No entanto, a microbiologia marinha, no geral, tem sido negligenciada comparativamente aos estudos de microrganismos terrestres, nomeadamente devido a problemas de logística associada com a amostragem de *habitats* marinhos, especialmente do alto mar e do fundo do mar. Consequentemente, o estudo de certos aspetos de microbiologia marinha tornou-se apenas possível apenas com os desenvolvimentos de engenharia marinha para amostragem de sedimentos em alto mar, amostras isobáricas *in situ*, e perfurações oceânicas, entre outros.⁵⁹

A diversidade microbiana em ambientes marinhos é, atualmente um recurso valioso para a biotecnologia. Os produtos naturais marinhos têm-se tornado alvos fascinantes para biólogos e químicos, na descoberta de compostos com novas e/ou melhoradas aplicações clínicas. Os microrganismos marinhos, em particular, abrangem um grupo importante de produtores de compostos naturais que apresentam diversas atividades, como antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena e antiviral.^{57,59}

As actinobactérias (*actinomycetes*), cuja palavra é derivada do Grego (*aktis* – raio e *mykes* – fungo) devido à observação inicial da sua morfologia, são um grupo de bactérias gram positivas filamentosas e esporuladas com DNA rico em guanina (G) e citosina (C) (55 – 75 %) pertencentes à ordem *Actinomycetales*. Foram originalmente considerados como formando um grupo intermediário entre bactérias e fungos, e posteriormente, foram reconhecidos como organismos procarióticos.^{60,61}

Em termos de quantidade e variedade de espécies identificadas, o filo *Actinobacteria* representa uma das maiores unidades taxonómicas. Inclui organismos que apresentam ou aparentam uma tendência para o crescimento micelial, sendo que atualmente se conhecem 39 famílias e 130 géneros (Figura 1.16). Exibem uma variedade de morfologias desde cocoide (p.e., *Micrococcus*), cocoide com haste (p.e., *Arthrobacter*) a formas de hifas fragmentadas (p.e., *Nocardia* spp.) ou com micélio ramificado (p.e., *Streptomyces* spp.) (Figura 1.17).⁶²

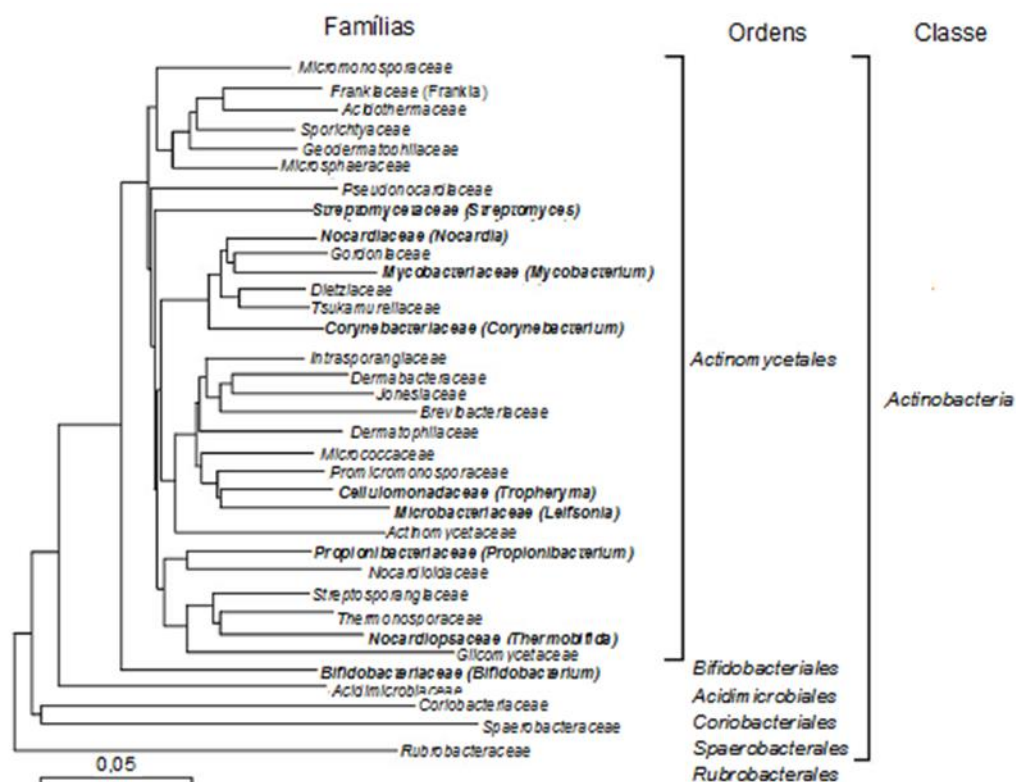


Figura 1.16: Árvore filogenética da classe *Actinobacteria* baseada na sequência 16S rRNA. As famílias contendo membros sujeitos ao sequenciamento completo do genoma estão destacadas a negrito. [adaptado de 62]

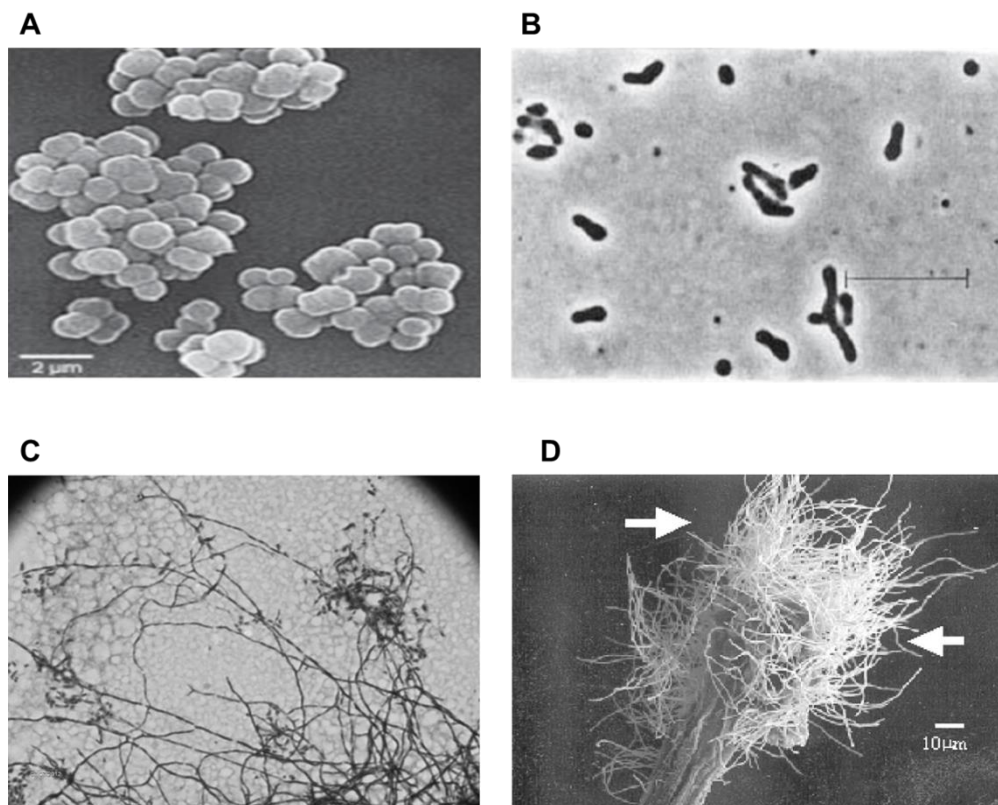


Figura 1.17: Diferentes morfologias dos organismos pertencentes ao filo *Actinobacteria* (A) micrografia eletrônica (*Electron Micrograph* - EM) de uma espécie de *Micrococcus* isolada a partir de âmbar; (B) foto da espécie *Arthrobacter globiformis* após 24 h de crescimento; (C) aparência microscópica de espécies do género *Nocardia* e (D) imagem obtida por microscopia eletrônica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy* – SEM) de uma espécie pertencente ao género *Strepomyces* (as setas indicam o micélio ramificado) ^[adaptado de 63–66]

As actinobactérias são organismos aeróbios e estão presentes em vários *habitats* ecológicos, como solos, água doce, lagos, adubo, esgoto e ambiente marinho, sendo predominantes em solos secos e alcalinos.⁶⁷

Estas bactérias são os procariontes com maior valor ecológico, económico e biotecnológico.^[13] A nível ecológico, são responsáveis pela digestão de hidratos de carbono resistentes, tais como, quitina e celulose, pelo odor agradável do solo, pela degradação de materiais tóxicos e são utilizados na biorremediação, pelo desempenho importante na reciclagem de carbono orgânico e na capacidade de degradar polímeros complexos.⁶⁸ Para além disso, o seu metabolismo é versátil na produção de diversos produtos naturais, designados como metabolitos secundários. Estes compostos possuem uma diversidade de utilizações industriais, com importância económica e biotecnológica, agindo como agentes antineoplásticos, antifúngicos, antimicrobianos, antitumorais, imunossupressivos e agentes responsáveis pelo crescimento de plantas e herbicidas.^{69–71}

Em 1970 foram descritos cerca de 32 géneros de actinobactérias isoladas de sedimentos marinhos com base na composição química. Recentemente os géneros *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcua*, *Dietzia*, *Prauserella*, *Serinicoccus*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Lamerjespora*, *Marinospora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*, *Williamsia*, *Verrucispora*, *Marinactinospora* e *Sciscionella* têm sido reportados em ambientes marinhos.⁵⁷

1.2.1 Origem e Diversidade de Actinobactérias Marinhas

Os membros pertencentes ao filo *Actinobacteria* são considerados típicos habitantes de ambientes terrestres devido à sua ampla ocorrência e abundância no solo. A sua distribuição em ambiente marinho permaneceu desconhecida por muitos anos, e até foram originalmente considerados como esporos lavados a partir da terra. No entanto, certas evidências têm vindo a sugerir que este tipo de bactérias possa estar presente numa variedade de *habitats* de ambiente marinho.^{72,73} Em 1983, Goodfellow e Williams estimaram que este tipo de bactérias constituía uma pequena fração da flora bacteriana nos *habitats* marinhos. Porém, em 2005 Bull et al. encontraram actinobactérias que representavam 9% de população bacteriana em sedimentos marinhos. Ao longo da década, as informações acerca da diversidade de actinobactérias em ambientes marinhos têm crescido consideravelmente.^{72,74} A biodiversidade de actinobacterias tem sido estudada a partir de diferentes nichos, como por exemplo, junto às águas costeiras e em ambiente manguezal. Kala e Chandrika, em 1993 isolaram *Rhodococcus*, *Dietsi*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Micromonospora* e *Gordonia* a partir deste ambiente. Em 2005, Niladevi e Prema isolaram 21 espécies na costa e 19 em salinas de Palk Bay, na Índia. Ainda em 2005, Jensen et al., descobriram que uns dos tipos de actinobactérias, as chamadas de indígenas, se encontravam em sedimentos marinhos.⁷⁴

1.2.2 Isolamento e Identificação de Actinobactérias Marinhas

Existem várias técnicas de isolamento de actinobactérias marinhas, sendo que nos convencionais (dependente e/ou independente de culturas), vários fatores devem ser considerados, tais como, a escolha da fonte de triagem, o meio de crescimento, as condições de cultura e o reconhecimento das colónias no isolamento primário.^{58,72}

A técnica independente de cultura consiste na extração direta de ácidos nucleicos a partir de amostras e, muitas vezes envolve a amplificação de ácido desoxirribonucleico complementar (complementary *deoxyribonucleic acid*, cDNA) a partir de ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*, RNA) por reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR), e posterior análise da

diversidade das moléculas amplificadas. Alternativamente, os produtos amplificados podem ser clonados e sequenciados de forma a identificar e enumerar novas actinobactérias presentes na amostra.⁵⁷

Uma abordagem alternativa consiste em tornar o procedimento de isolamento mais seletivo por adição de químicos, como o fenol, à suspensão dos sedimentos. Vários meios têm sido recomendados para o isolamento destas bactérias em amostras marinhas, sendo que foi desenvolvido um meio de crescimento especializado para isolar algumas espécies de actinobactérias, usando macromoléculas como a caseína, quitina e ácido húmico. Alguns antibióticos são também utilizados com objetivo de inibir microrganismos indesejados, incluindo bactérias de rápido crescimento e fungos.⁷²

As estirpes são identificadas preliminarmente de acordo com os seus critérios morfológicos, tais como, características das colónias na placa, morfologia do substrato, micélio e hifas aéreas, morfologia dos esporos, os pigmentos produzidos, perfil químico da parede celular, padrão de açúcar da célula, e por ai adiante, sendo posteriormente confirmadas pela análise de RNAr 16s. É prática comum o uso de unidades taxonómicas operacionais (*operational taxonomic units OTU*) para definir espécies.^{57,72}

1.2.3 Género *Salinispora*

O género *Salinispora* pertencente à família *Micromonosporaceae*, representa o primeiro grupo de actinobactérias marinhas sendo reportado como MAR 1 pela primeira vez, em 2002, por Mincer *et al.* Em 2006 foram reportados mais 12 grupos de 5 famílias com a mesma designação (MAR), que foi dada devido ao requisito obrigatório de água do mar para o crescimento das bactérias pertencentes a esses mesmos grupos (Figura 1.18).^{75,76}

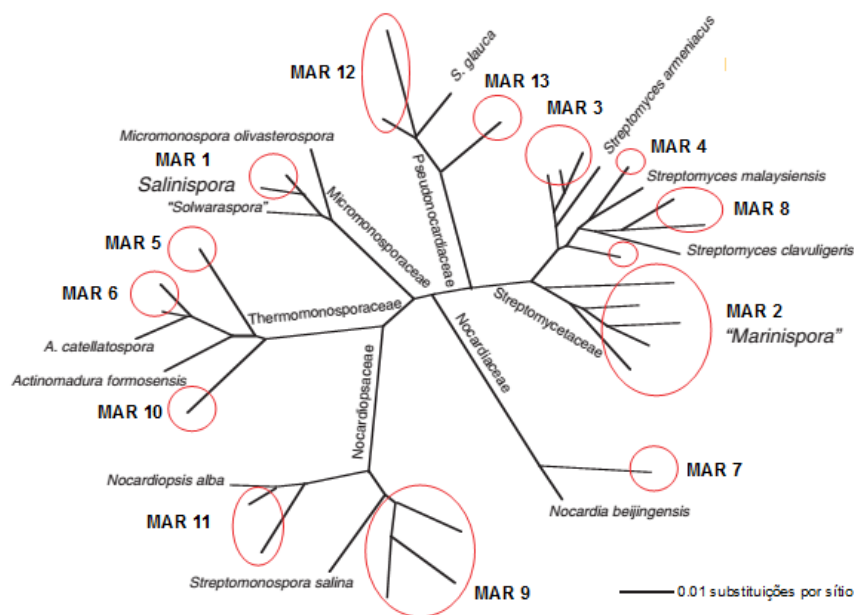


Figura 1.18: Árvore radial retratando as relações filogenéticas de 13 grupos de derivados de actinobactérias marinhas em seis famílias diferentes. Encontra-se incluído o género *Salinispora* (MAR 1), assim como o grupo MAR 2 para o qual uma descrição formal como género *Malinispora* ainda se encontra em progresso. A classificação taxonómica dos outros grupos MAR ainda permanece incerta, mas é provável que incluam novas espécies.^[adaptado de 76]

Este género é atualmente composto por duas espécies *Salinispora tropica* e *Salinispora arenicola*, que podem ser distinguidas uma da outra a partir de uma combinação de propriedades químicas, genéticas e fenotípicas. Para além destas duas espécies, uma terceira foi proposta com o nome de *Salinispora pacifica*.^{75,77-79} Os genomas de *S. tropica* e *S. arenicola* são atualmente conhecidos como tendo 5183331 e 5786361 nucleótidos, respectivamente. No caso da *S. pacifica* o seu genoma ainda continua desconhecido (dados fornecidos pelo sítio: <http://www.genome.jp/kegg/genome.html>).

Tal como referido anteriormente, são bactérias Gram-positivas, aeróbias, com esporos lisos na superfície, possuindo hifas muito ramificadas. Crescem somente em água do mar ou num meio contendo sódio, a temperaturas entre 10 - 30 °C e pH entre 7 - 12. São reconhecidas pela ausência de hifas aéreas e pela sua pigmentação característica, que pode ir de laranja pálido a preto (Figura 1.19).⁷⁷

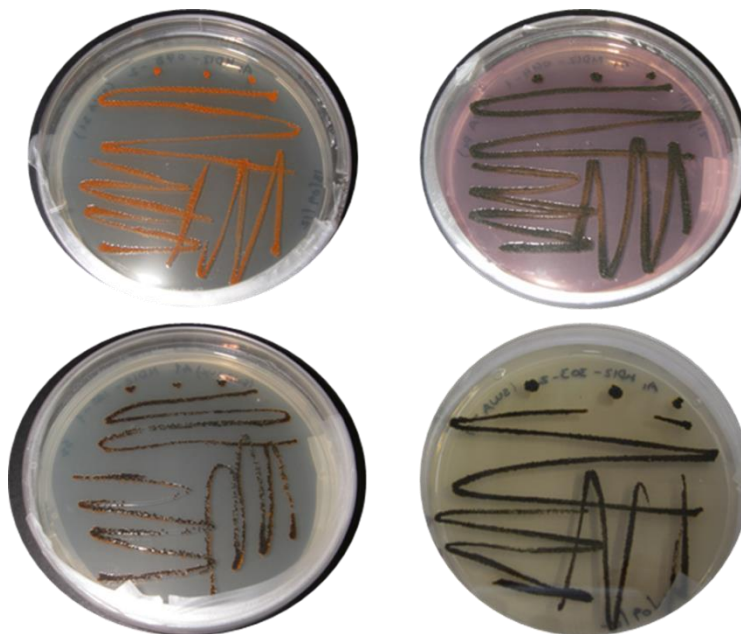


Figura 1.19: Colônias de actinobactérias de pigmentação diversa características do género *Salinispora*. (fotos fornecidas pela Doutora Susana Gaudêncio)

Este género encontra-se amplamente distribuído por todo o mundo, nomeadamente em sedimentos marinhos tropicais e subtropicais, como por exemplo o Mar das Caraíbas, o Mar de Cortes, o Mar Vermelho, o oceano Atlântico Tropical das Bahamas e o oceano Pacífico Tropical da ilha do Guão. Pode ainda ser encontrado em esponjas do mar provenientes da grande Barreira do Coral Australiana.^{78,80}

1.2.3.1 Metabolitos Secundários de *Salinispora* spp.

Em 2003, Feling et al. reportaram a existência do primeiro metabolito secundário produzido durante a fermentação de *S. tropica*, denominado de salinosporamida A.^{81,82} Desde então, este género de actinobactérias marinhas tem sido alvo de descoberta de novos metabolitos secundários.

A salinosporamida A é um β -lactona γ -lactâmico bicíclico, e um inibidor potente do proteossoma mamífero. Alguns estudos têm revelado que este metabolito pode induzir a apoptose de células de mieloma múltiplo, células do cancro do cólon, de leucemia linfocítica crónica, aguda e mielóide aguda.⁸²

Existem outros metabolitos secundários produzidos por *S. tropica*, nomeadamente salinosporamida B e C em que o primeiro resulta da perda do cloro do salinosporamida A.^{83,84} Mais

dois metabolitos são produzidos por esta espécie, designados por esporalídeo A e B cuja atividade biológica permanece desconhecida.⁸⁵

Quanto à espécie *S. arenicola*, foram reportados metabolitos secundários como os arenicolídeos A, B e C tendo atividade citotóxica, arenimicina com atividades antibacteriana e anticancerígena, ciclomarina A com atividades anti-inflamatória e antiviral, rifamicina que possui atividade antibiótica, salinictal que atua na quimio-prevenção contra o cancro e staurosporina com atividade anticancerígena.⁸⁵⁻⁸⁷

Por último, a espécie *S. pacífica* foi documentada por produzir também metabolitos secundários, tais como, o cianosporasídeo A cuja atividade não é conhecida, as pacificanonas A e B com atividade antibacteriana e as salinipironas A e B com atividade citotóxica.^{85,88}

Todas as estruturas dos metabolitos referidos encontram-se representadas nas Figuras 1.20 e 1.21.

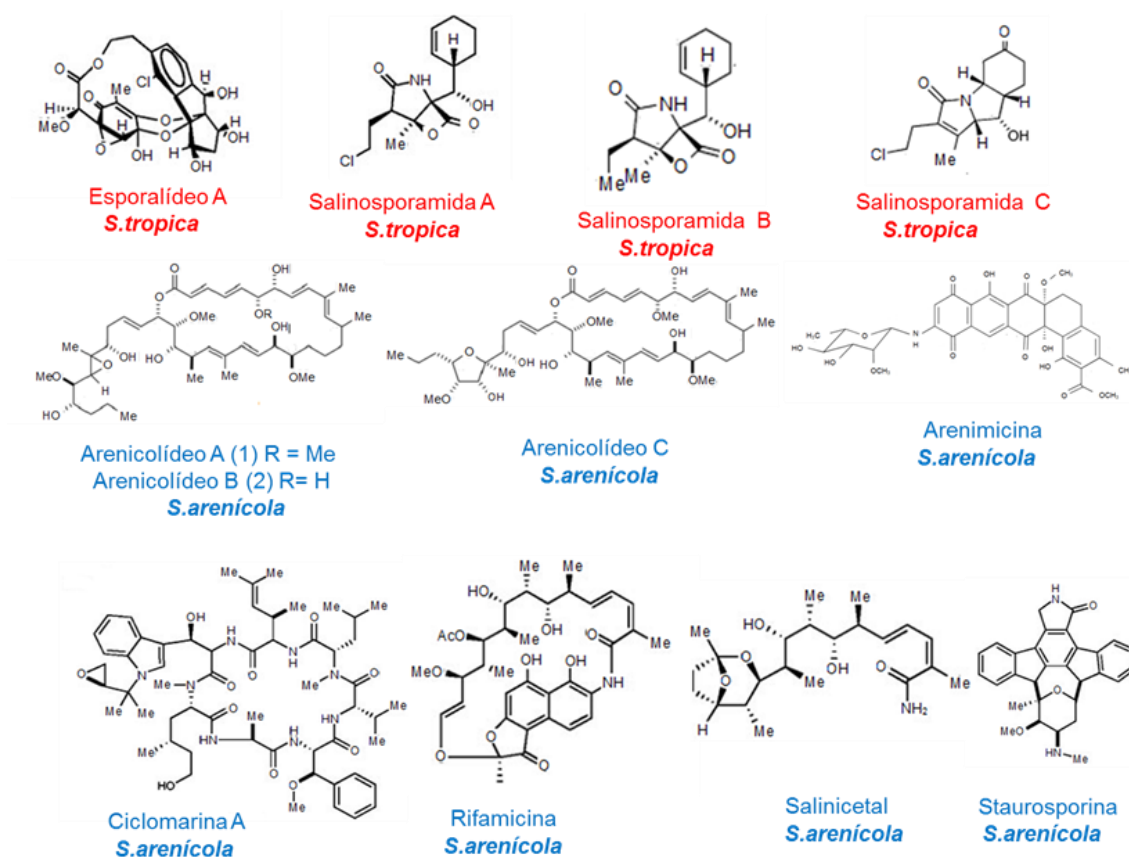


Figura 1.20: Metabolitos secundários produzidos pelas espécies *S. tropica* (a vermelho) e *S. arenicola* (a azul). [adaptado de 84-87]

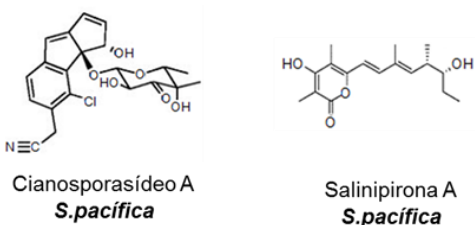


Figura 1.21: Metabolitos secundários produzidos pela espécie *S. pacífica*. [adaptado de 85,88]

A maioria dos metabolitos derivados das espécies *Salinispora* são policetídeos (*polyketides*, PKs) ou péptidos não ribossomais (*non-ribosomal peptides*, NRPs) ou seus híbridos, que são sintetizados por grandes complexos multi-enzimáticos: as sintetases de policetídeos (*polyketide synthases*, PKSs) ou sintetases de péptidos não-ribossomais (*non-ribosomal peptide synthetases*, NRPSs).⁸⁹

Estudos comparativos dos genomas das actinobactérias *S. tropica* e *S. arenicola* revelam que 75% dos genes específicos das espécies encontra-se localizado em 21 ilhas genómicas, e que os genes responsáveis pela síntese de produtos naturais, compostos por PKS e NPKS, ocupam 8,8% e 10,9% dos seus genomas, respetivamente.⁹⁰ Estes resultados sugerem que a produção de metabolitos secundários possa estar associada à adaptação ecológica e que a aquisição de genes de biossíntese de produtos naturais representa uma diversificação bacteriana ainda desconhecida.⁸⁹

1.2.4 Proteómica

Em geral, as actinobactérias geralmente são exploradas como biofármacos naturais por produzirem uma ampla gama de pequenos metabolitos bioativos utilizados em medicina, na indústria alimentar, química e em estratégias de biorremediação. As condições ambientais e os estímulos são sinais que promovem a síntese destes compostos através da ativação de uma cascata de reguladores controlando a expressão de genes.⁹¹

Certos metabolitos, como os antibióticos, são geralmente sintetizados com rendimentos bastante baixos. Por isso, as estratégias de engenharia genética para aumentar o rendimento de produção têm sido de grande interesse, podendo beneficiar da análise da expressão genética global. De facto, o desenvolvimento de técnicas de elevado rendimento para estudar a expressão genética global, tem demonstrado novas oportunidades para compreender as relações entre o metabolismo basal e a síntese de moléculas bioactivas. Em particular, as análises diferenciais de proteomas realizadas por electroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massa, são ferramentas valiosas para o estudo das mudanças no perfil da expressão dos genes que podem

dar pistas em relação à regulação de processos biológicos e vias metabólicas que suportam, tanto a biomassa, como a produção de metabolitos secundários.⁹²

Como referido anteriormente, a maioria destes produtos naturais são sintetizados por sintetases de péptidos não-ribossomais e por sintetases de policétidos. Estas proteínas têm uma massa molecular superior a 200 kDa e possuem iões marcadores exclusivos derivados do seu cofactor em comum, a fosfopanteteína (*phosphopantetheine*, PP) (dado fornecido por: www.ebi.ac.uk).⁹³

Devido a estas características, têm sido desenvolvidas duas novas abordagens proteómicas: PrISM (*Proteomic Investigation of Secondary Metabolism*) e OASIS (*Orthogonal Active Site Identification System*) para a deteção seletiva de expressão de conjuntos de genes NRPS / PKS em proteomas microbianos, sem a necessidade de informação acerca do sequenciamento de genoma.^{93,94}

O PrISM inicia o processo da descoberta do produto natural a partir da deteção de enzimas biossintéticas usando informação proteómica para dirigir a descoberta de genes biossintéticos expressos e os seus produtos naturais correspondentes. Esta abordagem tem como objetivos encontrar novos produtos naturais, novas vias e transformações biossintéticas e associar grupos de genes com os seus metabolitos biossintéticos. Ao contrário do PrISM, que seleciona as NRPS/PKS pelo seu tamanho, o OASIS reage quimicamente com os seus sítios ativos.⁹³

Vários estudos proteómicos têm sido reportados até à data, com o objetivo de entender as relações entre os perfis globais de expressão de proteínas e a produção de metabolitos secundários em diferentes condições (crescimento, mutantes, entre outros) Exemplos de espécies de actinobactérias estudadas até agora são a *Amycolatopsis balhimycina*, *Streptomyces coelicolor* e *Streptomyces lividans*.^{90,93–95}

1.2.5 Objetivos

Deste modo, neste trabalho utilizou-se uma abordagem proteómica diferencial, baseada em 2DE com o objetivo de caracterizar as proteínas envolvidas na produção de compostos bioativos nas espécies *S. arenicola* e *S. pacifica*. Adicionalmente, esta informação poderá ser útil para a identificação possíveis biomarcadores em filotipos de bactérias marinhas quimicamente prolíficas

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2 Materiais e Métodos

2.1 Bactérias Redutoras de Sulfato

2.1.1 Reagentes

Para a realização dos crescimentos celulares utilizaram-se casaminoácidos proveniente da Difco; ácido nitrilo tri-acético (> 99%) e biotina (Vit.H) da marca Fluka; cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, > 99%), cloreto de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, > 99%), cloreto de ferro tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, > 99%), cloreto de níquel hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, > 99%), molibdato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99,5%), nitrato de sódio (NaNO_3 , > 99,5%), piridoxina (Vit.B6), riboflavina (Vit.B2, 99%), selenito de sódio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99%), sulfato de cobalto heptahidratado ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99%), sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99%), sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99,5%), sulfato de manganês hidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 99%), sulfato de alumínio e potássio dodecahidratado ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 99,5%), sulfato de sódio (Na_2SO_4 , 99%), sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99,5%), tiamina (Vit.B1) todos provenientes da Merck; cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, > 99%) e sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99%) da Panreac; citrato de sódio (99,5%) e cloreto de sódio (> 99,8%) provenientes da Ridel-de-Haen, cianocobalamina (Vit. B12) da Roche; triptona adquirida à Scharlau e lactato de sódio da marca Sigma.

Para a preparação dos extratos proteicos foram utilizados inibidores de proteases (*complete EDTA free*) e desoxirribonuclease I (*DeoxyrinoNuclease I*, DNaseI) provenientes da Roche, e ribonuclease I (RNaseI) adquirido à Sigma, todos com grau de pureza para biologia molecular.

O tampão de amostra para a realização dos géis unidimensionais foi preparado com ditioneitol (*dithiotreitol*, DTT, 99%) proveniente da GE Healthcare; azul de bromofenol proveniente da Merck; glicerol (87%) adquirido à Panreac; ácido clorídrico (*hydrochloric acid*, HCl, 37%) da Pronalab; N-dodecil-sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*, SDS, ≥ 99%) e tris-base (*tris-base (hydroxymethyl) aminomethane*, 99,9%) provenientes da Sigma. Os géis para SDS-PAGE foram preparados com uma solução de 40%:3% acrilamida:bis (razão 37.5:1 ideal para electroforese); persulfato de amônia (PSA, 98%) e tetrametiletilenediamina (*tetramethylethylenediamine*, TEMED, 99%) da GE Healthcare; HCl (37%) da Pronalab; SDS (≥ 99%) e tris-base (99,9%) adquiridos à Sigma. Para os géis nativos utilizaram-se as soluções de igual composição, com exceção do SDS, o qual não foi incluído no gel.

A solução de reidratação das *strips* usadas na 1ª dimensão da eletroforese bi-dimensional foi constituída por 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (3-[(3-*cholamidopopyl*)-*dimethylammonio*]-1-propanesulfonate, CHAPS, 99%) da Calbiochem; DTT (99%) e tampão de

gradientes de pH imobilizados (*immobilized pH gradient, IPG buffer*) pH 3-10 provenientes da GE Healthcare; tioureia (99%) e ureia (99,5%) da Merck.

Para o equilíbrio das *strips* foram utilizadas duas soluções: uma em que se usou DTT (99%) da marca GE Healthcare; azul de bromofenol e ureia (99,5%) da Merck; glicerol (87%) da Panreac; HCl (37%) da Pronalab; SDS ($\geq 99\%$) e tris-base provenientes da Sigma. A segunda, com mesma composição da primeira, mas em vez do DTT utilizou-se 2-iodoacetamida (com grau de pureza ideal para síntese) adquirida à Merck.

Para a preparação dos géis de poliacrilamida de 2ª dimensão de 2DE usou-se uma solução de 40%:3% acrilamida:bis (razão 37.5:1 ideal para eletroforese); agarose (com grau de pureza ideal para separação de ácidos nucleicos) persulfato de amónia (PSA, 98%) e TEMED (99%) adquiridos à GE Healthcare; HCl (37%) da Pronalab; SDS (≥ 99) e tris-base (99,9%) da Sigma e isopropanol da Riedel.

As soluções de coloração e descoloração usadas, tanto na eletroforese unidimensional como bidimensional, foram preparadas com ácido ortofosfórico (85%) e azul brilhante de coomassie (*Coomassie Brilliant Blue G250*, CBB G25, com grau de pureza para eletroforese) provenientes da Merck; etanol (96%) da Scarlab; sulfato de alumínio hexadecahidratado ($\geq 95,0\%$) da Sigma.

O tampão de amostra utilizado para os géis nativos de 1ª dimensão foi preparado com ditioneitol (DTT, 99%) proveniente da GE Healthcare; azul de bromofenol proveniente da Merck; glicerol (87%) adquirido à Panreac; e tris-base-base (99,9%) provenientes da Sigma.

Por fim, para a realização dos ensaios enzimáticos foram utilizados N-(1-naftil)etilenoamino dihidroclorato (*n-(1-naphthyl)ethylenediamine*, NEDA, 98%) e viologénio de metilo (*methyl viologen*, MV, 98%) provenientes da Aldrich; ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 87%), hidróxido de sódio (NaOH, 99%) nitrato de sódio (NaNO_3 , 99%) nitrito de sódio (NaNO_2 , 99%) e sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, SA, 99%) adquiridos à Merck, hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3 , 99,7%) da Panreac, (HCl, 37%) da Pronalab.

Todas as soluções foram preparadas com água de pureza A proveniente de sistemas Millipore MilliQ (resistividade $> 18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$, a 25°C).

2.1.2 Equipamentos

Os meios de crescimento das bactérias foram esterilizados na autoclave *Uniclave 88* e as células foram crescidas numa incubadora com agitação (*Shaking Incubator*) da ShellLab. Para a recolha de células foi usada a centrífuga *Avanti J-25* (rotor JA-10) da Beckman. As células foram homogeneizadas no homogeneizador *Potter-Elvehjem* da Multifix, partidas numa prensa francesa (*French Press*, *Thermo-FA-080A*) e centrifugadas na centrífuga *Sigma 3K30* (rotor Nr.12156). Nos ensaios espectrofotométricos foram utilizados dois espectrofotómetros da marca *Shimadzu* dos

modelos *UV-180* e *UV 160-A*. Os géis desnaturantes e nativos unidimensionais foram polimerizados no *caster* da Mini-Protean 3 da BioRad. Para a focagem isoeletrica foi usado o sistema *Ettan IPGphor 3* da GE Healthcare. As *strips* foram equilibradas num agitador basculante (*Rocking Platform*) da VWR. Os géis 2D foram polimerizados no *caster Ettan Dalt Six* da GE Healthcare e corados e descorados num agitador orbital (*Certomat® S*). Para os ensaios enzimáticos foi utilizado um banho termostatzado (Eppendorf® *Thermomixer Compact*) da Sigma.

2.1.3 Crescimento Celular

As bactérias foram crescidas sob condições anaeróbias, a 37 °C e em meio semi-definido (VMN) contendo nitrato e sulfato como aceitadores de eletrões.⁹⁶ A composição do meio encontra-se descrita nas Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3. Foram realizados três pré-inóculos de 100 mL cada (10% do volume total), antes dos crescimentos de 1 ou 2 L, a partir dos quais as células foram recolhidas às 16 horas após o início do crescimento. A taxa de crescimento foi determinada a partir da medição da densidade ótica (D.O.) a 600 nm. A recolha das células foi realizada por centrifugação do meio de cultura a 10000 x g (15 minutos, 10 °C). O *pellet* obtido foi lavado numa nova centrifugação com tampão fosfato 10 mM pH 7,6, ressuspendido no mesmo tampão, numa proporção de 1:3 e armazenado a -80 °C.

Tabela 2.1: Composição do meio de crescimento de bactérias redutoras de sulfato. O pH foi ajustado para 7,45 - 7,55 com KOH. A solução foi desarejada e esterilizada na autoclave por cerca 20 min a 120 °C.

Reagentes	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	0,5
NH ₄ Cl	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04
Lactato de sódio	6,0
Citrato de sódio	0,3
Elixir de Wolfes	1 mL (Tabela 2.2)
Casaminoácidos	2,0
Tryptona	2,0
Solução de vitaminas	2 mL (Tabela 2.3)
Meio de Sulfato	
Na ₂ SO ₄	4.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,060
FeO ₄ .7H ₂ O	0,004
Meio de Nitrato	
NaNO ₃	2,4
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,050
FeCl ₂ .4H ₂ O	0,003

Tabela 2.2: Composição de 200 mL da solução de vitaminas. O pH foi ajustado para 7,4 com tampão tris-HCl 50 mM após dissolução da riboflavina com NaOH 1 M. A solução foi esterilizada com filtros de 0,2 µm.

Reagentes	Quantidade
Vit.B2 - Riboflavina	0,02 g
Vit.B3 - Ácido nicotínico	0,05 g
Vit.B1 - Tiamina	0,06 g
Vit.B5 - Ácido pentoténico	0,06 g
Vit.B6 - Piridoxina	0,06 g
Vit.B12 - Cicrocobalamina	0,005 g
Vit.C - Ácido ascórbico	0,2 g
Vit.H - Biotina	0,001 g

Tabela 2.3: Composição do elixir de Wolfes. O pH foi ajustado para 6,5 - 7,0 com KOH.

Reagentes	Concentração (g/L)
Ácido nitriloacético	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,0
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5
NaCl	1,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,1
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,1
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
Alk(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	0,01
H ₃ BO ₃	0,01
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,01
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	0,001

2.1.4 Preparação da amostra

As células foram homogeneizadas na presença de um *cocktail* inibidor de proteases numa concentração final de 0,2 mg/mL e de uma mistura de endonucleases, DNaseI e RNaseI de concentração final 0,005 mg/mL. De seguida, as células foram lisadas numa prensa francesa a cerca de 16000 *psi* e centrifugadas a 8000 x *g* durante 15 minutos, a 4 °C, de modo a remover detritos celulares.

2.1.5 Quantificação de Proteína

A quantificação de proteína total das células de *D. desulfuricans* foi realizada com dois *kits* comerciais, o *BioRad Protein Assay* (BioRad) e o *2D Quant Kit* (GE Healthcare), de acordo com os protocolos do fornecedor.^{97,98} O *kit BioRad Protein Assay* fundamenta-se no método de Bradford onde é utilizado o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* cujo máximo de absorvância muda de 465 nm para 595 nm quando ligado às proteínas. Foi a este último comprimento de onda que se leram as absorvâncias. A concentração da proteína é diretamente proporcional à absorvância.

O *2D Quant Kit* baseia-se na ligação específica do ião cobre às proteínas. Neste método, utilizaram-se soluções de precipitante e de co-precipitante com o objetivo de precipitar as proteínas e assim eliminar as impurezas que possam interferir com o método de quantificação, as quais permanecem dissolvidas. De seguida, o sedimento foi recolhido e dissolvido numa solução contendo cobre. Adicionou-se um agente colorimétrico que reage com o cobre não ligado. Leu-se então a absorvância a 480 nm. Ao contrário do método referido anteriormente, existe uma proporcionalidade inversa entre a concentração de proteína e a intensidade da cor.

A albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA) (GE Healthcare) foi usada como solução padrão de proteína, em ambos os métodos. Os resultados foram comparáveis e o método mais simples, *BioRad Protein Assay*, passou a ser usado rotineiramente.

2.1.6 SDS-PAGE (1D)

As amostras foram incubadas em *tampão de amostra* composto por 0,0625 M de Tris-base-HCl a pH 6,8, 2% de SDS, 10% (v/v) de glicerol, 0,1 M de DTT e 0,01% de azul de bromofenol. De seguida, as amostras foram fervidas durante 3 minutos e centrifugadas (*spin down*) a baixa velocidade. Entretanto, foram preparados os géis de separação com 0,375 M de tampão Tris-base-HCl pH 8,8, 12,5% de acrilamida:bis, 0,2 % SDS, 0,05% TEMED e 0,05% PSA e os géis de concentração com 0,128 M de Tris-base-HCl pH 6,8, 5% de acrilamida:bis, 0,2% SDS, 0,05%

de TEMED e de PSA. Para finalizar aplicaram-se as amostras e o marcador de pesos moleculares nos vários poços do gel. A corrida de eletroforese foi realizada em duas fases: 1) 80 V durante 30 minutos e 2) 150 V por mais 1 hora e 30 minutos, aproximadamente.

2.1.7 Eletroforese Bidimensional (2D)

2.1.7.1 Reidratação da strips

As *strips* de IPG (*Immobiline Dry Strips*) ou seja, as tiras de gel de poliacrilamida (18 cm) com gradientes de pH imobilizados de 4 a 7 foram reidratadas *overnight* numa solução de reidratação 2D composta por 7 M de ureia, 2 M de tiourea, 2% de CHAPS (m/v), 0,5% (v/v) de tampão de IPG pH 3 - 10, 0,002% de azul de bromofenol (m/v) e 0,28% (m/v) de DTT e 350 µg de amostra.

2.1.7.2 1ª Dimensão – Focagem Isoelétrica

Após a reidratação das *strips*, realizou-se a focagem isoelétrica a 20 °C, com um programa de 4 passos:

passo 1: voltagem constante de 500 V (4 horas, 2000 Vh)

passo 2: gradiente de voltagem de 500 V até 1000 V (4 horas, 3000 Vh)

passo 3: gradiente de voltagem de 1000 V até 10000 V (3 horas, 16500 Vh)

passo 4: voltagem constante de 10000 V (3 horas, 30000 Vh)

somando-se num total de 61,5 Kv, corridos em 15 horas.

2.1.7.3 Equilíbrio das strips

Em seguida, as *strips* foram preparadas para a segunda dimensão através de dois passos de equilíbrio. No primeiro passo, foram mergulhadas numa solução de *tampão de equilíbrio* desnaturante (6 M de ureia, 50 mM de Tris-base-HCl a pH 8,8, 30% (v/v) de glicerol, 2% (m/v) de SDS e 0,002% de azul de bromofenol) com 10 mg/mL de DTT, sob agitação basculante durante 15 minutos. No segundo passo, foram novamente incubadas numa mesma solução mas com 25 mg/mL de 2-iodoacetamida, igualmente sob agitação basculante durante 15 minutos.

2.1.7.4 2ª Dimensão – SDS-PAGE

A segunda dimensão foi efetuada em géis de poliacrilamida de 21 x 27 cm, numa unidade vertical⁹⁹. O gel foi preparado com 0,375 M de tampão Tris-base-HCl pH 8,8, 12,5% de acrilamida:bis, 0,2% SDS, 0,05% de TEMED e 0,04% de PSA. Após o equilíbrio das *strips* (secção 2.7.3), estas foram colocadas diretamente no topo do gel e os vidros selados com 1% de solução de agarose em tampão de corrida [0,025 M de Tris-base, 0,192 M de glicina e 0,2% de SDS]. Por fim, a eletroforese foi realizada tendo-se aplicado primeiramente uma voltagem de 80 V durante 30 minutos para que a amostra migrasse da *strip* de IPG para o gel de 2ª dimensão. De seguida, deixou-se correr a eletroforese a uma voltagem constante de 350 V, durante aproximadamente 3 horas e 30 minutos.

2.1.8 Coloração do Gel

No fim da eletroforese, os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal [0,02% (m/v) de CBB G250, 5% (m/v) de sulfato de alumínio hexadecahidratado, 10% (v/v) etanol, 2% (v/v) de ácido ortofosfórico]. Para tal, retiraram-se os géis dos vidros e lavaram-se os mesmos com água destilada, 3 vezes durante 10 minutos, sob agitação orbital. Seguidamente, os géis foram incubados numa solução de azul *coomassie* coloidal *overnight* sob agitação suave. Os géis depois foram lavados em água destilada duas vezes, durante 5 minutos, e incubados numa solução de descoloração (*destaining solution*) [10% (v/v) de etanol e 2% (v/v) de ácido ortofosfórico] durante 2 horas. Por fim, os géis foram lavados novamente e deixados em água destilada.

2.1.9 Análise dos Géis 2D

A análise de imagem dos géis 2D, assim como a validação estatística das abundâncias relativas de proteínas nos géis, foram realizadas através do *software Melanie 7.0* da GeneBio. O valor do *spot* foi determinado a partir do seu volume que é calculado com base em 75% da altura máxima do *spot*. Uma vez que este volume depende da calibração de intensidade do pixel em cada gel, foi antes utilizado o volume relativo, que por sua vez, é um valor normalizado que considera o volume do *spot* em relação a todos os *spots* da imagem. Assim, este volume relativo mantém-se independente das variações devidas a diferentes quantidades de proteína aplicada no gel, assim como de efeitos da coloração do mesmo. De seguida, realizou-se o emparelhamento (*matching*) entre os géis, em que, as imagens destes foram comparadas de modo a encontrar correspondência entre *spots*, isto é, *spots* que representam a mesma proteína. Por fim, foi determinado um valor de razão de variação (*fold change*) entre a média dos volumes relativos dos

spots em cada classe. Considerou-se que quando a razão de variação era superior a 2 e o *p-value* menor que 0,05, as proteínas são expressas diferencialmente nas duas condições em análise (nitrato vs sulfato).

Na Figura 2.1 está representado um esquema que resume a obtenção e análise de cada proteoma, desde os crescimentos das bactérias, até a identificação dos *spots* expressos diferencialmente.

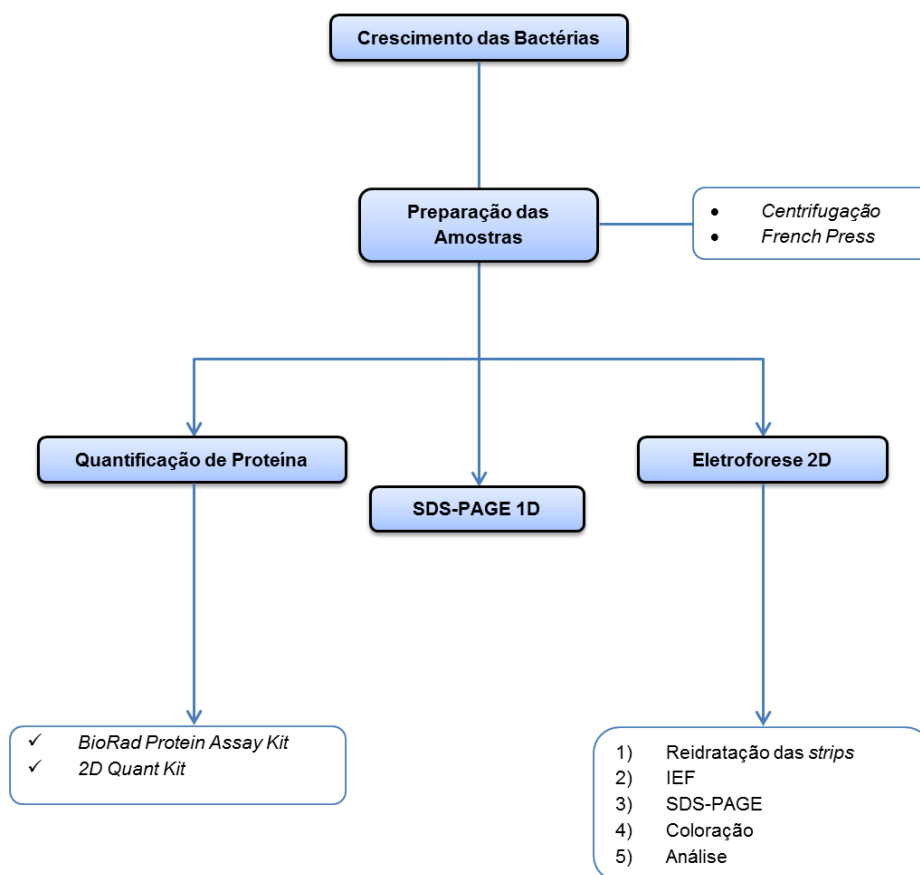


Figura 2.1: Esquema do protocolo experimental para a obtenção dos proteomas de *D. desulfuricans* por eletroforese 2D.

2.1.10 Ensaios Enzimáticos

As atividades enzimáticas de redutase de nitrito nos extratos proteicos das células da bactéria *D. desulfuricans* ATCC 27774 crescidas em meio contendo nitrato e sulfato foram

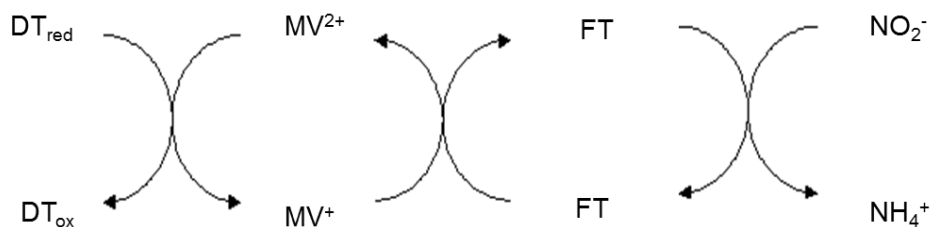
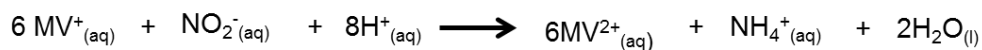
determinadas por ensaios descontínuos, que envolvem dois passos. O primeiro passo corresponde à conversão enzimática do nitrito a amónia, enquanto o segundo consiste na determinação quantitativa do nitrito consumido na mistura reacional. A conversão enzimática do nitrito a amónia necessita de um mediador redox que transfere os electrões à enzima, o viologénio de metilo, o qual é reduzido quimicamente por um agente redutor, o ditionito de sódio. A reação química, assim como o esquema reacional encontram-se apresentados na Figura 2.2.

Para o passo enzimático, a mistura reacional continha 200 µl de extrato proteico, 0,5 mM de viologénio de metilo como mediador e 0,5 mM de substrato (nitrito de sódio) em 0,2 M de tampão fosfato, pH 7,6. Foram também preparados dois tipos de ensaios controlo (um sem extrato, de modo a verificar se existia consumo ou formação de nitrito sem a ação da enzima e outro sem nitrito, considerado o branco, para verificar a absorvância das espécies presentes na mistura de reação). As reações foram iniciadas pela adição de 5 mM de ditionito de sódio (preparado em solução tamponada) e incubadas durante 5 minutos a 37 °C, sendo paradas pela oxidação do ditionito por agitação rigorosa num vórtex.

A quantificação do nitrito consumido foi efetuada pelo método de Griess. Este método foi primeiramente descrito por Johann Peter Griess, em 1879, e envolve a formação de um catião diazónico através da reação do nitrito com sulfanilamida (SA), que posteriormente acopla ao reagente NEDA, produzindo um composto azo de cor rosa que absorve a 540 nm.^{100,101} O esquema reacional do método de Griess encontra-se apresentado na Figura 2.3.

A mistura foi incubada durante 10 minutos, à temperatura ambiente e foi lida a absorvância a 540 nm. Os padrões do nitrito de sódio (0 - 50 nmol) foram preparados em água e a curva de calibração encontra-se apresentada na Figura 2.4.

Uma unidade de atividade enzimática (1 U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 µmol de nitrito por minuto. Pode ser igualmente definido como a quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 µmol de amónia por minuto.¹



¹ Não houve consumo de nitrito (ou formação de amónia) nos ensaios controlo.

Figura 2.2: Reação química e os modelos esquemáticos da redução do nitrito mediada pelo vilogênio de metilo e reduzido quimicamente pelo ditionito de sódio.

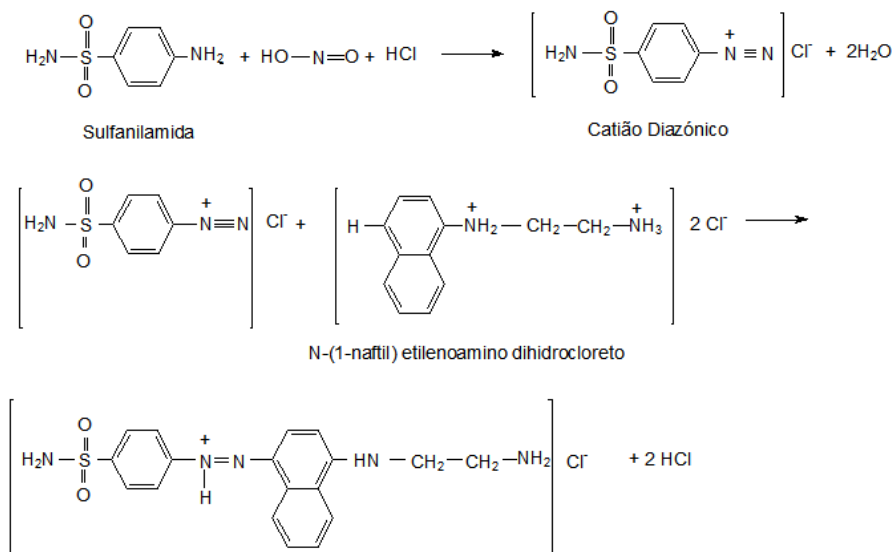


Figura 2.3: Esquema reacional do método de Griess.

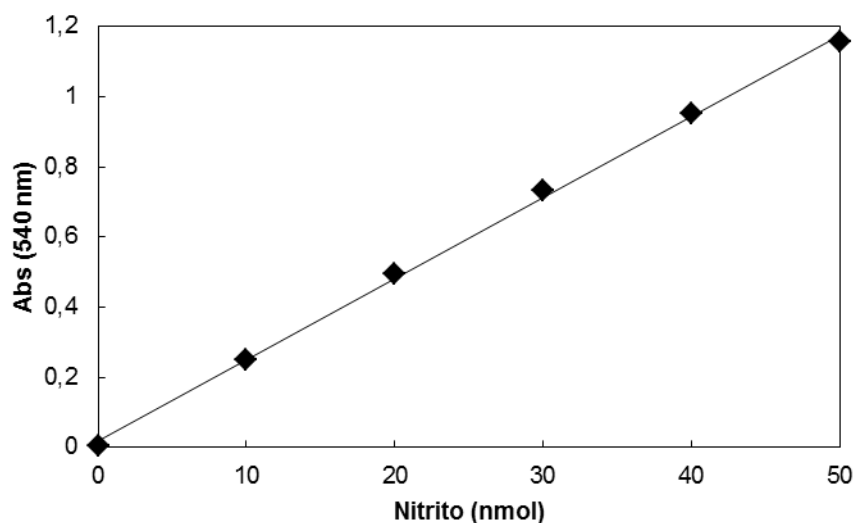


Figura 2.4: Curva de calibração para doseamento do nitrito, com base na reação colorimétrica do método de Griess ($y = 0,023x + 0,022$; $r^2 = 0,999$). Os valores correspondem à média de duplicados.

2.1.11 Ensaios de Atividade em Géis de Poliacrilamida Nativos

As amostras de extrato proteico total foram incubadas em *tampão de amostra* composto por 0,0625 M de Tris-base-HCl pH 6,8, 10% (v/v) de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. As

atividades em gel foram testadas em géis de poliacrilamida nativos preparados como na secção 2.1.6., mas sem SDS e sem ferver as amostras antes da sua análise. Após a corrida eletroforética, os géis foram revelados por três métodos distintos: 1) numa solução contendo 100 mM tampão fosfato pH 7,6, 20 mM de nitrito de sódio, 0,6 mM de viologénio de metilo, 6 mM de ditionito de sódio e 20 mM de nitrito de sódio como substrato; 2) solução igual à primeira mas com nitrato de sódio como substrato; 3) solução sem substrato. Os géis de atividade foram incubados durante 10 minutos. O primeiro método de coloração teve como objetivo a visualização da atividade da redutase do nitrito (Figura 2.2), o segundo foi usado para observar a atividade da redutase do nitrato (Figura 2.5) e o terceiro foi utilizado como controlo e para verificar a existência de reações não específicas com viologénio de metilo que é um agente redutor não específico, participando numa longa variedade de reações redox.

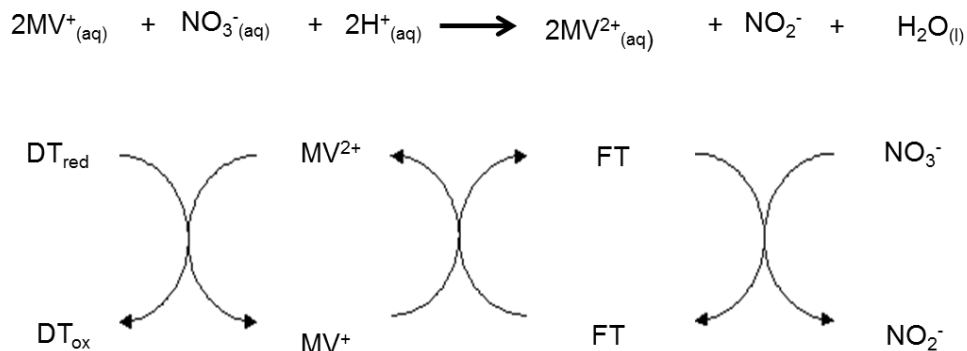


Figura 2.5: Reação química e os modelos esquemáticos da redução do nitrato mediada pelo viologénio de metilo e reduzido quimicamente pelo ditionito de sódio.

2.2 Actinobactérias Marinhas

2.2.1 Reagentes

Para a preparação da amostra de proteínas foram utilizados inibidores de proteases (*complete EDTA free*) e desoxiribonuclease I (DNase I) provenientes da Roche e ribonuclease I (RNase I) adquirido à Sigma, todos com elevado grau de pureza para biologia molecular.

A solução de reidratação das *strips* usada foi constituída por CHAPS (99%) proveniente da Calbiochem; DTT (99%) tampão de IPG pH 3 - 10 provenientes da GE Healthcare; tioureia (99%) e ureia (99,5%) provenientes da Merck.

Para o equilíbrio das *strips* foram utilizadas duas soluções: uma em que se usou DTT (99%) da marca GE Healthcare; azul de bromofenol e ureia (99,5%) da Merck; glicerol (87%) da Panreac; HCl (37%) da Pronalab; SDS ($\geq 99\%$) e tris-base provenientes da Sigma. A segunda, com mesma composição da primeira, mas em vez do DTT utilizou-se 2-iodoacetamida (com grau ideal para síntese) adquirida à Merck.

Para a preparação dos géis de poli(acrilamida de 2ª dimensão) usou-se uma solução de 40%:3% acrilamida:Bis (razão 37.5:1 ideal para eletroforese); agarose (elevado grau de pureza), PSA (98%) e TEMED (99%) adquiridos à GE Healthcare; HCl (37%) da Pronalab; SDS ($\geq 99\%$) e tris-base (99,9%) da Sigma e isopropanol da Riedel.

Para a coloração dos géis de poli(acrilamida) foram usadas soluções de coloração e descoloração preparadas com ácido ortofosfórico (85%) e azul brilhante de coomassie (*Coomassie Brilliant Blue G250*, CBB G25, com grau de pureza ideal para eletroforese) da marca Merck; etanol (96%) da Scarlabs; sulfato de alumínio hexadecahidratado ($\geq 95,0\%$) da Sigma.

Todas as soluções foram preparadas com água de pureza A proveniente de sistemas Millipore MilliQ (resistividade $> 18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$, a 25°C).

2.2.2 Equipamentos

As células foram homogeneizadas no homogeneizador *Potter-Elvehjem* da Multifix, partidas numa prensa francesa (*French Press*, *Thermo-FA-080A*) e centrifugadas na centrífuga *Sigma 3K30*. (rotor Nr 12156). Nos ensaios espectrofotométricos foi utilizado um espectrofotómetro *Shimadzu*, modelo *UV-180*. Para a focagem isoeletrica foi usado o sistema *Ettan IPGphor 3* da GE Healthcare. As *strips* foram equilibradas num agitador basculante (*Rocking Platform*) da VWR. Os géis foram polimerizados no *caster* da *Hoefer* e corados e descorados num agitador orbital (*Certomat® S*).

2.2.3 Crescimento das Bactérias e Preparação da Amostra

As actinobactérias foram isoladas e purificadas a partir de amostras de sedimentos marinhos recolhidos. A sua recolha foi efetuada no arquipélago da Madeira, mais propriamente nas Ilhas Desertas (amostra referenciada por PTM - 99) e no Porto Santo (amostra referenciada por PTM - 93). Estas amostras foram fornecidas pela Doutora Susana Gaudêncio do Lab 202, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Lisboa (projeto ref.- PTDC/QUIQUI/119116/2010). Todo o procedimento realizado até a obtenção das estirpes PTM - 99 e PTM - 93 ambas do género *Salinispora* (*Salinispora arenicola* e *Salinispora pacífica*, respetivamente) referidas encontra-se descrito na referência ¹⁰², com a seguinte alteração: o crescimento de 5 L foi realizado em meio A1 que é constituído essencialmente por peptona, extrato de levedura, amido e água do mar.

As células foram homogeneizadas na presença de um *cocktail* inibidor de proteases de concentração final de 0,2 mg/mL e de uma mistura de endonucleases, DNaseI e RNaseI de concentração final 0,010 mg/mL. De seguida, as células foram lisadas por prensa francesa a cerca de 16000 *psi* e centrifugadas a 8000 x *g* por 15 minutos a 4 °C, de modo a remover detritos celulares.

2.2.4 Quantificação de Proteína

A quantificação de proteína total das células das actinobactérias *S. salinispora* e *S. pacifica* foi realizada conforme descrito na secção 2.1.5.

2.2.5 Eletroforese Bidimensional (2D)

2.2.5.1 Reidratação das strips

Antes de reidratar as strips, as amostras foram tratadas com um *kit* de limpeza, denominado *2D Clean Up Kit*, conforme descrito na referência ¹⁰³. Este *kit* foi utilizado de modo a eliminar elevada condutividade e/ou interferentes das amostras, permitindo ainda a concentração de amostras demasiado diluídas. O procedimento consistiu na precipitação de substâncias interferentes, tais como detergentes, sais, lípidos, compostos fenólicos e ácidos nucleicos. No final deste protocolo o sedimento foi recolhido e lavado na solução de reidratação.

As *strips* de IPG de 13 cm e gradiente de pH 4 - 7 foram reidratadas *overnight* numa solução de reidratação 2D de igual composição à solução descrita na secção 2.1.7.1., mas com 4% de CHAPS (m/v), 1,5% (v/v) de tampão de IPG pH 3 - 10 e 250 µg de amostra.

2.2.5.2 1ª Dimensão - Focagem Isoelétrica

Após a reidratação das strips, realizou-se a focagem isoeletrica a 20 °C, com um programa de 4 passos:

passo 1: voltagem constante de 300 V (1 hora, 300 Vh)

passo 2: gradiente de voltagem de 300 V até 1000 V (1 hora, 650 Vh)

passo 3: gradiente de voltagem de 1000 V até 8000 V (2 horas e 30 minutos, 11250 Vh)

passo 4: voltagem constante de 10000 V (1 hora e 30 minutos, 12000 Vh)

somando-se num total de 24,2 Kv corridos em 6 horas.

2.2.5.3 Equilíbrio das strips

Este passo foi seguido de igual forma como descrito na secção 2.1.7.3.

2.2.5.4 2ª Dimensão - SDS-PAGE

Procedeu-se da mesma forma como descrito na secção 2.1.7.4. com as seguintes alterações: o casting dos géis de poliacrilamida (16 x 16 cm) foi efetuado no *caster* da *Hoefer*. A corrida de eletroforese foi realizada tendo-se aplicado primeiramente uma voltagem de 80 V durante 30 minutos e de seguida deixou-se correr a uma voltagem constante de 250 V, durante aproximadamente 3 horas.

2.2.6 Coloração do Gel

Os géis foram corados de acordo com o procedimento descrito na secção 2.1.8.

2.2.7 Análise do Géis 2D

A análise dos géis foi realizada pelo *software Melanie 7.0*, da GeneBio, da mesma forma como foi reportado na secção 2.1.9

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3 Resultados e Discussão

3.1 Bactérias Redutoras do Sulfato

3.1.1 Crescimento Celular

As curvas de crescimento das células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 obtidas neste trabalho em meio VMN contendo nitrato ou sulfato encontram-se representadas na Figura 3.1 (A) (foram representados os valores médios de 3 ensaios individuais para cada condição). Estas apresentam uma fase inicial de crescimento lento (fase *lag*) (cerca de 4 horas), após a qual as células começam a crescer exponencialmente até aproximadamente as 10 horas, para células de nitrato e 15 horas para células de sulfato, seguindo-se uma fase estacionária em que as velocidades de divisão e morte celular se aproximam. O gráfico B da Figura 3.1 corresponde às curvas de crescimento das células de *D. desulfuricans* obtidas em 2008 nas mesmas condições, cuja discussão será feita mais à frente.

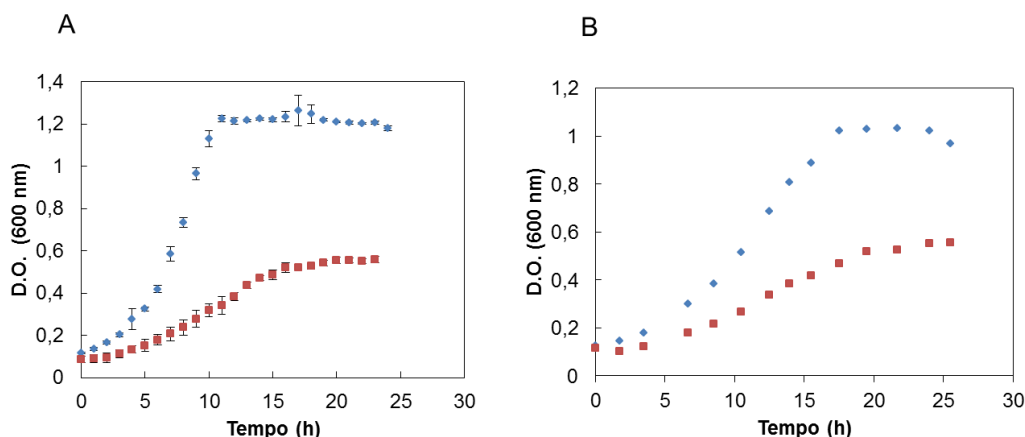


Figura 3.1: Curvas de crescimento de células de *D. desulfuricans* em meio contendo nitrato (♦) e sulfato (■) no trabalho realizado em 2014 (A) e em 2008 (B). Os valores no gráfico A são a mediana de três valores individuais.

É de referir que os pontos das curvas de crescimento da Figura 3.1 (A) foram determinados a partir de uma amostra com 12 horas de incubação e outra acabada de inocular de modo a cobrir as 24 horas de crescimento ([0 – 12 horas] e [12 – 24 horas]). Da análise comparativa das curvas de crescimento salienta-se que as diferentes fases de crescimento estão bem definidas na curva obtida em meio contendo nitrato, e que pelo contrário é difícil distinguir entre a fase *lag* e a exponencial das células crescidas em sulfato. Observa-se também que as

células crescem mais rapidamente em meio contendo nitrato do que sulfato, o que poderá ser atribuído ao facto da redução do nitrato ser termodinamicamente mais favorável. Para além disto, os produtos finais da redução do sulfato (sulfuretos) são tóxicos para as células, inibindo assim o seu crescimento. Não obstante, sabe-se que na presença dos dois substratos o sulfato é usado preferencialmente pelas células.^{104,105} A inibição do crescimento de *D. desulfuricans* em meio VMN de sulfato pelos produtos do metabolismo daquele substrato oxidante é acentuada pelas condições experimentais utilizadas, isto é, as células foram crescidas em anaerobiose, num sistema de cultura *batch* num volume fixo de meio de cultura e sem renovação da fase gasosa.

As curvas de crescimento correspondentes ao gráfico B da Figura 3.1 foram obtidas em 2008 e apresentam a fase inicial e um crescimento exponencial até 18 horas no meio contendo nitrato e 19 horas no meio contendo sulfato. Pode-se verificar que o formato das curvas (2008 vs 2014) é semelhante, embora no gráfico A, a curva das células crescidas em meio contendo nitrato exiba uma fase exponencial mais acentuada. Foi calculada a razão entre os rendimentos do crescimento celular de *D. desulfuricans* em meio contendo sulfato *versus* o meio contendo nitrato, para os gráficos A (2014) e B (2008) tendo-se obtido os valores de 54% e 42%, respetivamente. O valor obtido em 2008 é bastante similar ao reportado em 2009 por Marietou *et al.* (45% no meio Postgate a 30 °C)¹⁰⁴, enquanto o obtido durante a realização desta tese é mais elevado. Esta diferença sugere um perfil diferente de crescimento que será discutido mais à frente.

Os parâmetros de crescimento celular, tais como, a taxa específica de crescimento (μ) e o tempo de duplicação (Td), para as várias curvas de crescimento foram determinados a partir do traçado semi-logaritmico da fase exponencial. Os valores encontram-se representados na Tabela 3.1

Tabela 3.1: Taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (Td) das células de *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato e sulfato em 2008 e em 2014.

	2008		2014	
	Nitrato	Sulfato	Nitrato	Sulfato
μ (h ⁻¹)	0,101	0,085	0,238	0,151
Td (h)	6,9	8,2	2,9	4,6

Como esperado, os valores de μ são superiores e os valores de Td, por sua vez, são inferiores, no meio contendo nitrato, em ambos os estudos (2008 e 2014), exibindo uma variação de duas vezes, tanto entre eles, como entre os dois momentos em que os estudos foram realizados. Uma vez que estes parâmetros são característicos da estirpe e dependem das condições e crescimento, as diferenças encontradas são reflexo das modificações induzidas no metabolismo pela alteração do aceitador terminal de eletrões. Em ambos os casos, 2008 e 2014, confirma-se um crescimento mais favorável das células quando o nitrato é o aceitador final de eletrões pelos motivos anteriormente mencionados (a redução do nitrato é termodinamicamente

mais favorável, e os sulfuretos são tóxicos para as células). Por outro lado, ao comparar os valores entre 2008 e 2014, juntamente com o formato das curvas, constata-se que houve de facto alterações no perfil de crescimento das células. Essas alterações foram associadas às repicagens sucessivas entre as culturas celulares e à possível seleção de populações com um crescimento mais acelerado ao longo dos seis anos. Por outro lado, é também possível que os componentes do meio de cultura cuja composição é semi-definida (triptona e casaminoácidos), sejam ligeiramente diferentes nas duas situações, o que também pode ter influenciado o crescimento das células.

As células de *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato e sulfato foram recolhidas às 16 horas de crescimento. Depois de centrifugadas, no primeiro caso obteve-se entre 3,5 e 4,5 g de biomassa/L de meio, enquanto que no segundo caso, se obteve entre 1,5 e 2 g de biomassa/L de meio (peso húmido). Após lavagem das células em tampão, estas foram ressuspensas num volume proporcional à sua biomassa.

3.1.2 Quantificação de Proteína

A eletroforese bidimensional requer uma quantificação precisa da amostra a ser analisada para assegurar que a quantidade de proteína total que se aplica na *strip* seja sempre a mesma em todos os ensaios. No entanto, essa quantificação torna-se difícil, uma vez que muitos dos reagentes utilizados para preparar e solubilizar as amostras, incluindo detergentes, redutores, agentes caotrópicos e anfólitos, são incompatíveis com ensaios de proteínas comuns.⁵³ Por esta razão, neste trabalho, a quantificação da proteína total das amostras da bactéria *D. desulfuricans* ATCC 27774 foi realizada por dois métodos diferentes: *BioRad Protein Assay* (método de Bradford) e *2D Quant kit*.

As curvas de calibração obtidas para cada método encontram-se representadas na Figura 3.1.

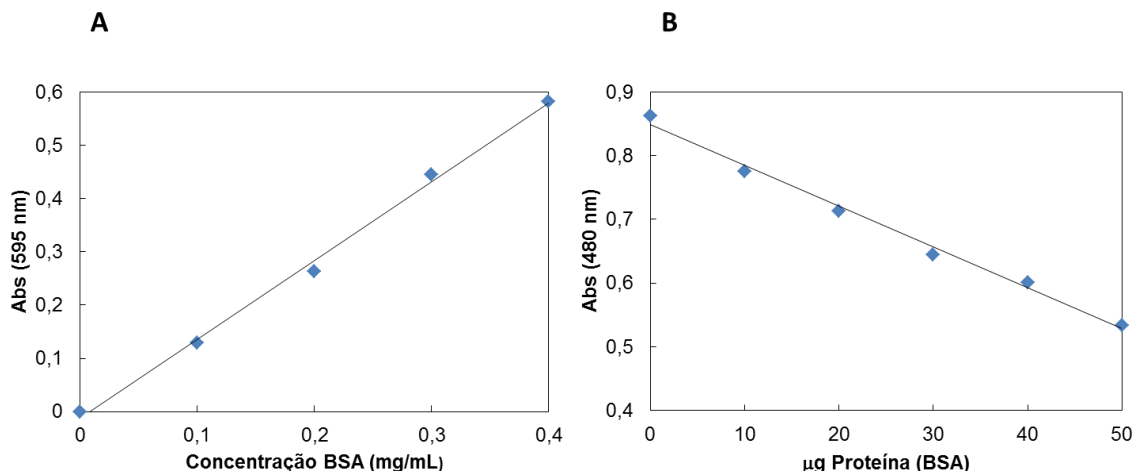


Figura 3.2: Curvas de calibração utilizadas para quantificação das amostras da bactéria *D. desulfuricans* ATCC 27774 por (A) *BioRad Protein Assay* ($y = 1,479x - 0,012$; $r^2 = 0,996$) e (B) *2D Quant kit* ($y = -0,006x + 0,848$; $r^2 = 0,992$). A proteína utilizada como padrão foi BSA. Em ambos os gráficos os valores correspondem à média de duplicados.

Pela observação da Figura 3.2 (A), que representa a curva de calibração obtida para o *kit BioRad Protein Assay* que se baseia no método de Bradford, pode-se observar que existe uma proporcionalidade direta entre absorvância e concentração de proteína, daí o declive da reta de ajuste à curva de calibração ser positivo. Pelo contrário, o declive da reta de ajuste à curva da figura 3.2 (B), obtida pelo *2D Quant kit*, é negativo. Este método baseia-se na ligação específica dos íons cobre (Cu^{2+}) às proteínas. Nele são utilizados soluções de precipitante e co-precipitante específicas que permitem obter um sedimento proteico que é depois dissolvido numa solução contendo cobre. De seguida adiciona-se um agente colorimétrico que reage com o cobre não ligado, e que é monitorizado a 480 nm. Deste modo, à medida que a concentração de proteína aumenta a intensidade da cor diminui, ou seja existe uma proporcionalidade inversa entre a concentração de proteína e a absorvância e daí a curva ter um declive negativo.

Através da equação da reta de ajuste destas curvas de calibração foi possível obter as concentrações das diferentes amostras, cujos valores se encontram apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Valores de concentração de proteína total para as amostras de *D. desulfuricans*. Foram realizados duplicados para cada amostra, que por sua vez correspondem a triplicados biológicos de crescimentos em meio contendo nitrato e sulfato.

	Amostras	Concentração (mg/mL)	Concentração (mg/mL)
		<i>BioRad Protein Assay</i>	<i>2D Quant Kit</i>
Nitrato	1	14,6 ± 0,1	16,1 ± 0,1
	2	15,9 ± 0,4	16,8 ± 0,8
	3	16,4 ± 0,6	17,3 ± 0,7
Sulfato	1	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,6
	2	7,5 ± 0,3	7,8 ± 0,7
	3	8,35 ± 0,01	8,74 ± 0,07

Através da análise da Tabela 3.2, é possível verificar que os valores de concentração de proteína total das diferentes amostras não varia muito de método para método, concluindo-se que ambos são adequados para a quantificação de proteínas neste tipo de amostra. No entanto, os valores obtidos pelo método *2D Quant kit* possuem erros mais elevados do que os obtidos para o primeiro método. Isto poderá ser devido à perda de proteína durante os vários passos do procedimento. Assim sendo, o método de Bradford foi selecionado para utilização rotineira neste trabalho, pois para além de ser mais vantajoso do ponto de vista económico, tem menos passos de manipulação da amostra.

É de salientar que ao comparar as concentrações de proteína total entre as diferentes amostras se verifica que as de células crescidas em meio contendo nitrato encontram-se mais concentradas do que as crescidas em sulfato. Esta discrepância foi bastante consistente entre replicados biológicos. Note-se que ambas as amostras celulares, depois de recolhidas e lavadas foram ressuspensas num volume proporcional à sua quantidade, aproximando o mais possível as concentrações celulares. Não sendo da responsabilidade do fator de diluição, as concentrações de proteínas dever-se-ão a fatores intrínsecos às próprias frações celulares. Assim sendo, os dados sugerem que a expressão proteica está globalmente aumentada na presença do substrato respiratório nitrato.

3.1.3 Eletroforese 2D

Os extratos proteicos totais foram analisados através de uma eletroforese bidimensional de modo a avaliar como o substrato oxidante influencia a expressão de proteínas em *D. desulfuricans*. Os proteomas estão representados nas Figuras 3.3 e 3.4

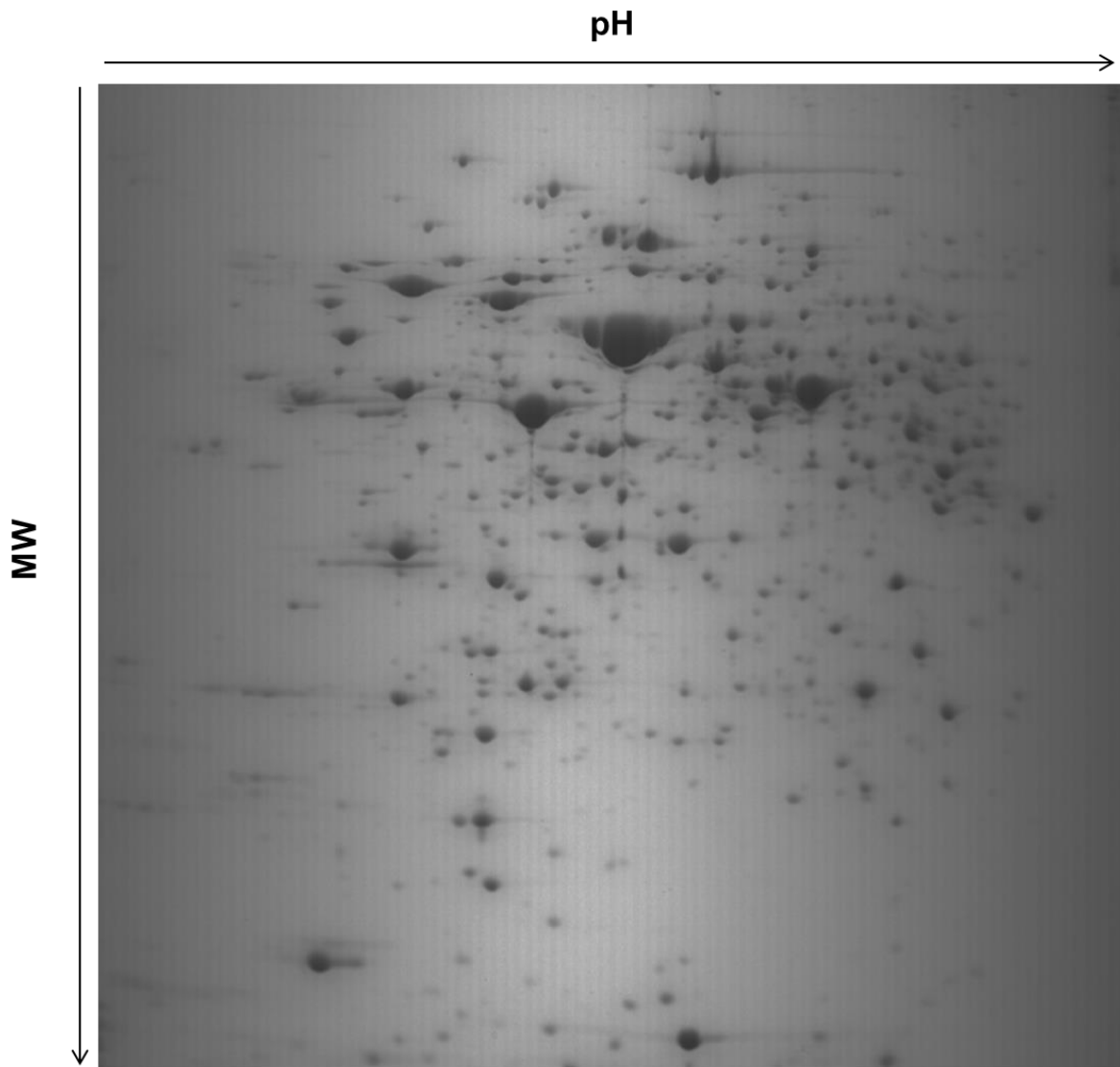


Figura 3.3: Mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 crescidas em meio contendo nitrato. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 18 cm de pH 4 - 7, seguido por electroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*]

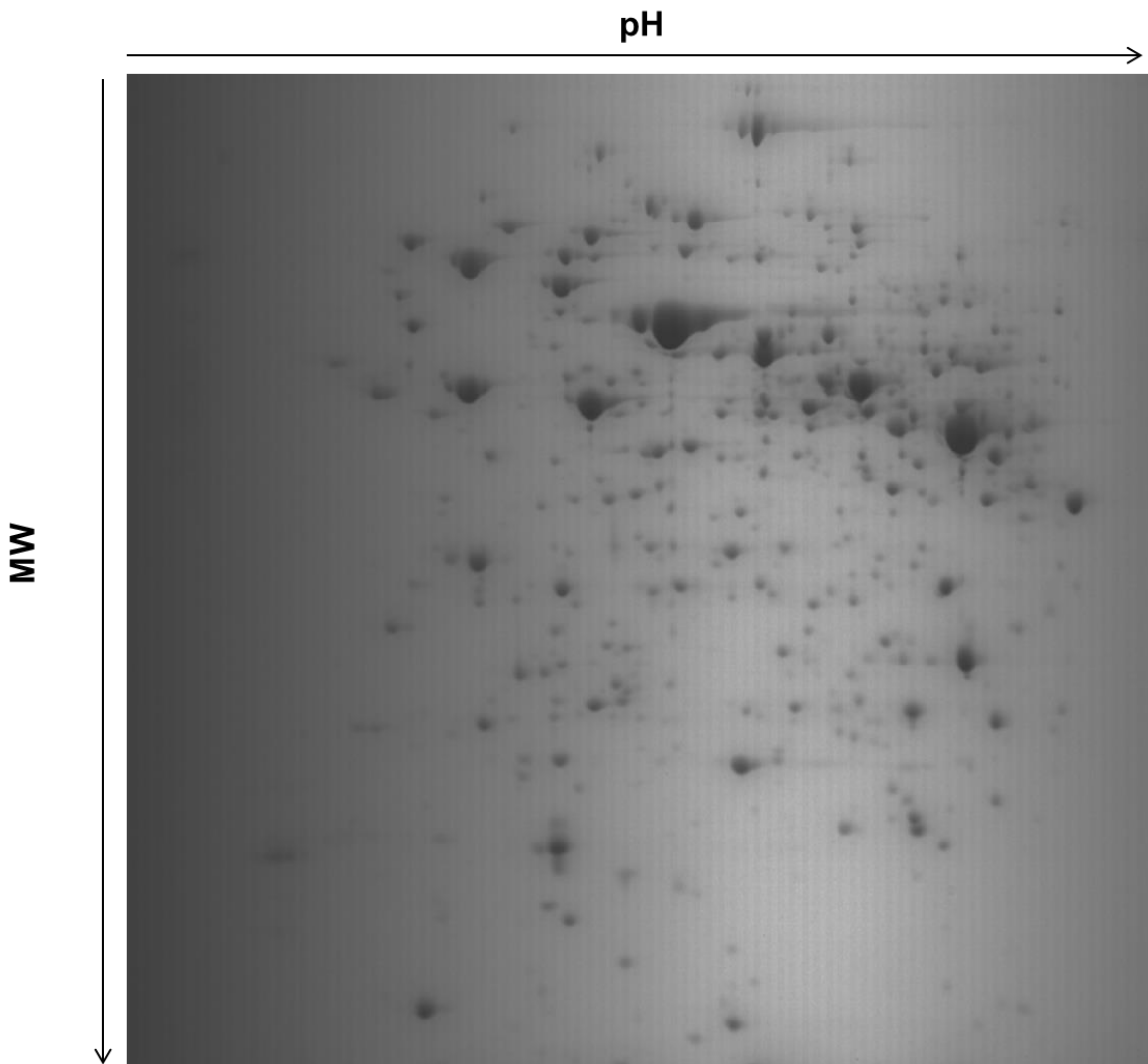


Figura 3.4: Mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 crescidas em meio contendo sulfato. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 18 cm de pH 4 - 7, seguido por electroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*]

Em trabalhos realizados anteriormente no nosso laboratório, as células de *D. desulfuricans* foram analisadas por 2DE (*strips* de IPG de 18 cm, pH 3 - 10 NL; SDS-PAGE 12,5% de acrilamida), depois de separadas em fração solúvel e membranas. Contudo, estes géis demonstraram a ocorrência de contaminação cruzada entre as duas frações. Como tal, neste trabalho optou-se por analisar a fração celular total, obtida após o rompimento das paredes celulares por ação de uma prensa francesa. Devido ao maior número de proteínas visualizadas e consequente complexidade dos proteomas optou-se por analisar as frações totais numa gama estreita de pH 4 - 7.

As imagens dos géis 2D (Figuras 3.3 e 3.4) foram processadas pelo *software Melanie 7.0* tendo-se verificado uma maior quantidade de *spots* de proteínas entre a gama de pH 5 a 7 e com

massas moleculares relativas entre 40 e 100 kDa. Numa primeira análise foram detetados 604 *spots* no gel de nitrato e 519 *spots* no gel de sulfato (valores correspondentes à média de nove géis de três replicados biológicos). A diferença do número de *spots* entre géis é concordante com o facto das frações de sulfato apresentarem invariavelmente concentrações proteicas mais baixas (ver discussão secção 3.1.2). Os motivos desta diferença deverão assentar nos efeitos dos substratos oxidantes na expressão das proteínas. Neste caso, as células crescidas em meio contendo sulfato, encontram-se no meio “ideal” para este tipo de bactérias, e como tal podem ter expressado as proteínas apenas necessárias para o seu metabolismo base, ou até possivelmente menos, devido ao facto de terem crescido em condições anaeróbias. Já as células crescidas em meio contendo nitrato, terão de expressar proteínas de mecanismos adicionais que garantam a sua adaptação à diferente condição de crescimento.

Os proteomas analisados são de extratos proteicos totais, o que corresponde a todas as proteínas (solúveis e membranares), e como tal, devia-se ter detetado um maior número de proteínas, o que não aconteceu. Isto pode ter-se devido ao facto de, por exemplo, as células não terem sido lisadas convenientemente, ou ter havido uma solubilização incompleta da amostra, levando a perdas de algumas proteínas, mais concretamente as membranares.¹⁰⁶ No entanto, acrescenta-se que a análise apresentada nesta tese refere-se somente à gama de pH 4 - 7, faltando ainda analisar estas frações proteicas totais em outros gradientes de pH.

De seguida, foi realizada uma análise estatística em que se consideraram como proteínas diferencialmente expressas as que apresentaram uma razão de variação do volume relativo do *spot* superior a 2 e o *p-value* (ANOVA) menor que 0,05. Sendo assim, foi possível identificar 42 *spots* diferenciais entre os dois géis 2D (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Spots diferenciais nos proteomas dos extratos proteicos de células de *D. desulfuricans* quando crescidas em meio contendo nitrato (N) ou sulfato (S).

Match ID	Volume Relativo do spot		Fold	ANOVA	Overexpression
	Sulfato	Nitrato			
19	0,0293	0,0673	2,2957	1,41E-02	Nitrato
28	0,0202	0,0525	2,5941	9,31E-03	
136	0,0425	0,1090	2,5657	2,26E-02	
235	0,3173	0,8888	2,8012	1,47E-08	
265	0,0383	0,1147	2,9942	3,86E-03	
268	0,2145	0,5703	2,6592	1,77E-02	
269	0,0864	0,2303	2,6659	5,80E-03	
277	0,1145	0,3029	2,6456	5,58E-03	
287	0,0392	0,0973	2,4848	1,39E-03	
303	0,0675	0,1542	2,2830	7,08E-06	
304	0,1116	0,2285	2,0473	8,45E-05	
316	0,0347	0,1486	4,2839	3,45E-03	
335	0,0355	0,1067	3,0058	6,16E-04	
359	0,0278	0,0847	3,0473	1,42E-03	
361	0,0800	0,2710	3,3880	2,25E-03	
376	0,1597	0,4768	2,9858	3,46E-05	
398	0,1376	0,3694	2,6841	4,31E-04	
422	0,0415	0,1244	2,9983	8,95E-03	
494	0,0715	0,1612	2,2545	6,12E-04	
496	0,2703	0,5716	2,1147	1,30E-03	
501	0,0345	0,0843	2,4482	1,36E-02	Sulfato
504	0,0255	0,0515	2,0163	3,22E-02	
10	0,1323	0,0294	4,4967	1,12E-12	
57	0,0762	0,0281	2,7078	1,36E-07	
69	0,9444	0,3007	3,1413	2,09E-07	
121	0,1919	0,0800	2,3991	1,11E-08	
130	0,9960	0,2438	4,0848	4,28E-11	
165	0,1953	0,0439	4,4478	5,06E-04	
177	0,1989	0,0960	2,0708	3,59E-08	
181	0,4264	0,1402	3,0410	1,25E-09	
196	0,1121	0,0432	2,5970	1,18E-05	
293	0,4132	0,0871	4,7448	3,28E-03	
309	0,5258	0,2525	2,0823	5,10E-05	
322	1,3438	0,6095	2,2048	1,01E-06	
342	0,4797	0,1250	3,8372	8,26E-06	
381	0,1726	0,0554	3,1143	4,43E-03	
407	0,1045	0,0464	2,2511	5,00E-03	
413	0,2278	0,1112	2,0481	8,40E-04	

449	0,1316	0,0434	3,0324	2,60E-05	Exclusivo Sulfato
450	0,4106	0,1680	2,4437	2,95E-02	
462	0,4809	0,1756	2,7385	4,68E-03	
506	0,3116	0,0846	3,6819	9,98E-11	
515	0,2331	—	—	1,64E-07	
516	0,1209	—	—	3,16E-06	
517	0,1300	—	—	1,49E-05	
518	0,0826	—	—	5,47E-11	
519	0,1362	—	—	3,71E-06	
520	0,0295	—	—	6,77E-08	
521	0,1461	—	—	3,57E-11	Exclusivo Nitrato
522	0,0516	—	—	8,93E-08	
523	0,0242	—	—	1,32E-04	
524	—	0,0460	—	1,13E-06	
525	—	0,1777	—	9,47E-10	
526	—	0,0263	—	6,83E-13	
527	—	0,0190	—	2,53E-06	
528	—	0,0174	—	8,79E-05	
529	—	0,0288	—	1,79E-04	
530	—	0,0534	—	3,40E-09	
531	—	0,0362	—	1,62E-07	
532	—	0,0508	—	8,81E-06	
533	—	0,0500	—	1,67E-03	
534	—	0,0275	—	3,88E-07	
535	—	0,0347	—	4,52E-11	
536	—	0,0691	—	2,49E-05	
537	—	0,0275	—	3,04E-08	
538	—	0,0520	—	4,49E-05	
539	—	0,0260	—	7,92E-11	
540	—	0,0277	—	1,30E-05	
541	—	0,0437	—	1,14E-05	
542	—	0,0751	—	6,15E-09	
543	—	0,0144	—	3,09E-07	
544	—	0,0154	—	2,57E-07	
545	—	0,0462	—	2,71E-08	
546	—	0,0453	—	1,35E-10	
547	—	0,0358	—	4,61E-12	
548	—	0,0785	—	2,50E-10	
549	—	0,0634	—	8,85E-05	
550	—	0,3489	—	4,56E-08	
551	—	0,5316	—	3,58E-06	
552	—	0,1386	—	5,17E-06	
553	—	0,1014	—	2,36E-08	

554	—	0,1378	—	3,77E-08
555	—	0,2035	—	8,94E-08
556	—	0,3441	—	8,90E-08
557	—	0,1017	—	4,12E-08
558	—	0,0709	—	6,53E-07
559	—	0,1100	—	1,58E-11
560	—	0,0467	—	2,04E-08
561	—	0,0639	—	9,41E-10
562	—	0,0999	—	1,09E-06
563	—	0,0648	—	2,54E-09
564	—	0,0884	—	1,59E-07
565	—	0,0639	—	1,77E-10
566	—	0,0388	—	3,57E-05
567	—	0,1477	—	4,65E-08
568	—	0,0297	—	8,03E-10
569	—	0,0685	—	1,72E-09
570	—	0,0209	—	5,93E-07
571	—	0,0971	—	1,23E-07
572	—	0,0594	—	3,79E-08
573	—	0,0366	—	2,67E-09
574	—	0,0409	—	1,23E-08
575	—	0,0379	—	1,42E-10
576	—	0,2491	—	2,34E-04
577	—	0,0523	—	2,44E-09
578	—	0,0253	—	1,40E-07
579	—	0,0392	—	5,17E-09
580	—	0,0303	—	5,20E-07
581	—	0,0908	—	3,14E-05
582	—	0,0820	—	2,63E-04
583	—	0,0571	—	1,95E-06
584	—	0,0369	—	6,74E-06
585	—	0,0689	—	8,78E-07
586	—	0,0511	—	5,56E-10
587	—	0,1726	—	1,13E-03
588	—	0,1546	—	3,40E-06
589	—	0,0499	—	8,07E-07
590	—	0,1200	—	3,96E-06
591	—	0,1150	—	2,67E-06
592	—	0,0740	—	1,90E-04
593	—	0,0346	—	3,45E-06
594	—	0,0304	—	5,33E-04
595	—	0,0236	—	2,02E-07
596	—	0,0320	—	9,28E-07

597	—	0,0170	—	1,04E-07
598	—	0,0438	—	1,56E-08
599	—	0,0437	—	2,12E-04
600	—	0,0502	—	2,18E-03
601	—	0,0296	—	4,37E-04
602	—	0,0503	—	8,34E-06
603	—	0,0137	—	3,97E-10
604	—	0,0941	—	3,63E-09
605	—	0,0452	—	3,48E-10
606	—	0,0648	—	2,10E-05
607	—	0,0540	—	1,46E-05
608	—	0,0183	—	6,85E-06
609	—	0,2021	—	1,11E-06
610	—	0,0639	—	8,23E-05
611	—	0,0361	—	4,56E-08
612	—	0,0110	—	1,42E-03
613	—	0,0186	—	3,73E-04

Pela análise da Tabela 3.3, verifica-se que entre os 42 *spots* diferenciais, 20 encontraram-se *overexpressed* no meio contendo sulfato. Para além disto, 9 *spots* são unicamente visualizados neste mesmo meio e 90 *spots* são detetados exclusivamente em nitrato (Figuras 3.5 e 3.6). Uma análise cuidada da razão dos volumes dos *spots* (*fold*) diferencialmente expressos, mostra ainda que estes valores são tendencialmente mais elevados para as proteínas *overpressed* em sulfato; o mesmo se observa no que diz respeito à abundância das proteínas exclusivas desta condição. Assim, pode-se concluir que diferentes substratos respiratórios têm consequências importantes na composição celular, afetando os níveis de expressão de um número significativo de proteínas em *D. desulfuricans* (cerca de 25% do total de *spots* identificados nos géis 2D). De algum modo, como já referido acima, este resultado suporta os dados relativos à concentração aumentada de proteínas nas amostras de células crescidas em meio contendo nitrato, esperando-se como tal diferenças substanciais entre os proteomas. Contudo, convém referir que os mapas 2D analisados resolvem apenas proteínas com *pI* compreendido entre 4 e 7, pelo que mais diferenças poderão ser encontradas noutras janelas de *pH*.

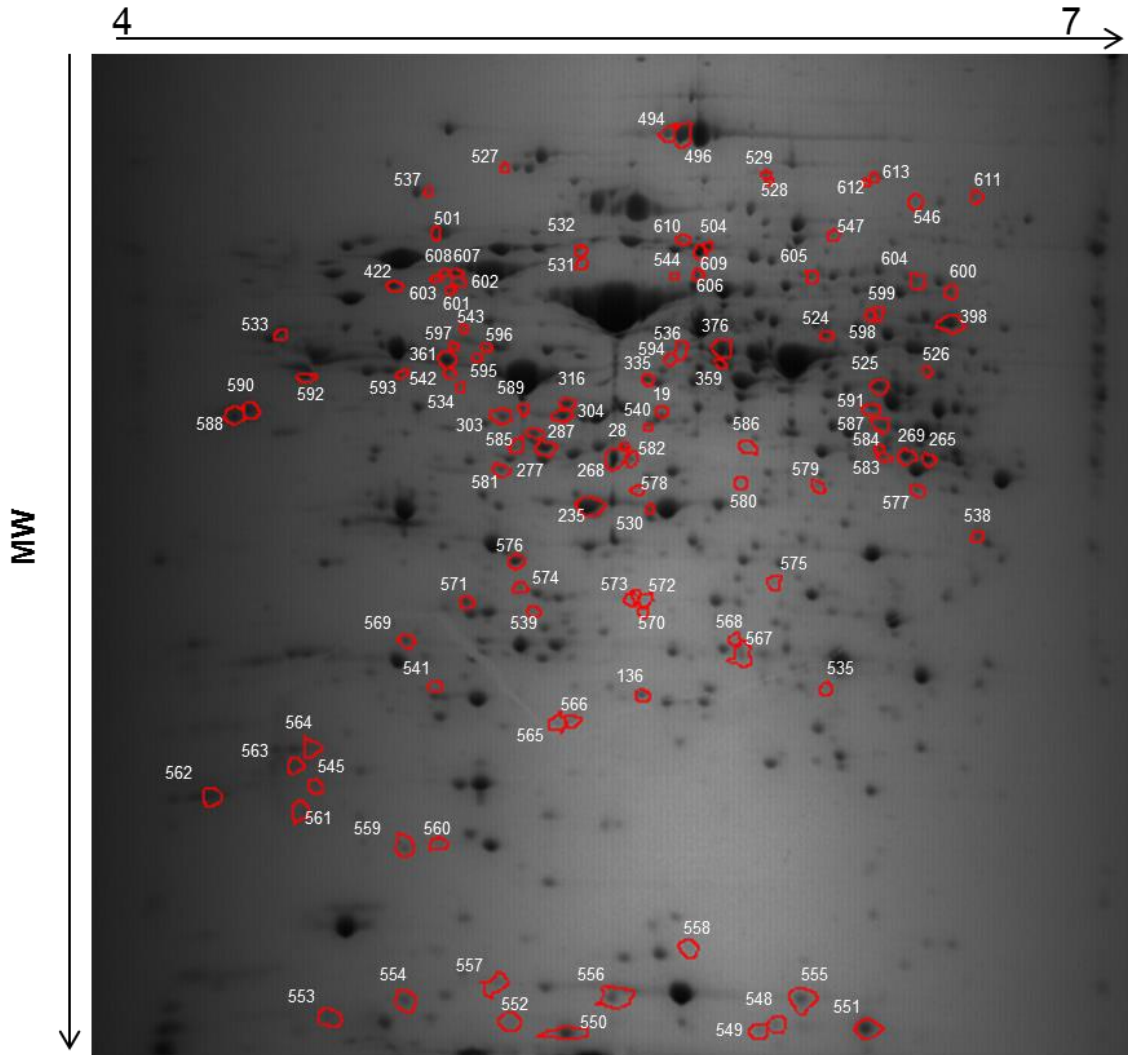


Figura 3.5: Spots diferenciais do mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 crescidas em meio contendo nitrato de acordo com os critérios *fold change* maior que 2 e ANOVA menor que 0,05. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 18 cm de pH 4 - 7, seguido por electroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no software *Melanie 7.0*]

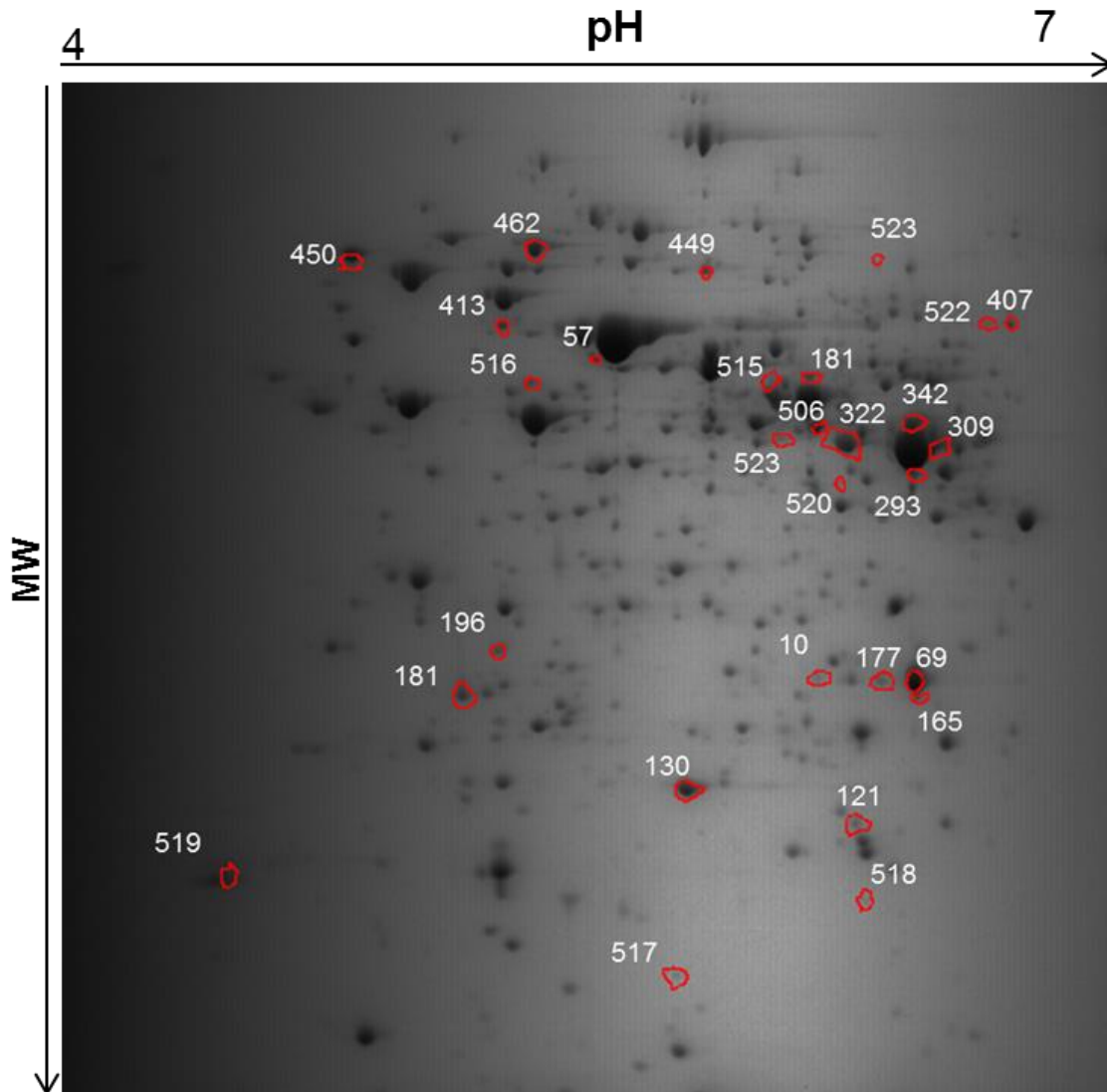


Figura 3.6: Spots diferenciais do mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 crescidas em meio contendo sulfato de acordo com os critérios *fold change* maior que 2 e ANOVA menor que 0,05. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 18 cm de pH 4 - 7, seguido por electroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*]

3.1.4 Ensaios Enzimáticos

Estudos prévios mostraram que as principais enzimas envolvidas na redução dissimilativa de sulfato se encontram presentes aproximadamente ao mesmo nível, quer sejam crescidas em meio contendo sulfato ou nitrato, enquanto que as enzimas envolvidas na redução dissimilativa de nitrato (p.e. redutase do nitrito) se encontram diferentemente expressas nos dois tipo de meios.⁴³ Como tal, foi-se estudar a atividade da redutase do nitrito e da redutase do nitrato nas células de *D. desulfuricans* crescidas em meios com os diferentes aceitadores finais de electrões. Estas atividades foram determinadas por ensaios em solução e em géis de poliacrilamida com separação por eletroforese nativa. Em ambos os ensaios os extratos foram incubados com uma mistura reacional contendo viologénio de metilo, ditionito de sódio, e substrato (nos ensaios em solução somente nitrito de sódio, enquanto os ensaios em gel, também nitrato de sódio).

Nos ensaios em solução, a atividade foi quantificada a partir da variação da concentração de nitrito no ensaio, utilizando-se para tal o método de Griess. Nos ensaios em gel a atividade foi avaliada qualitativamente por uma mera inspeção visual. Os resultados serão apresentados e discutidos nas secções seguintes.

3.1.4.1 Ensaios em Solução - Otimização do Tempo do Ensaio

Foram inicialmente realizados ensaios ao longo do tempo, de modo a determinar o período de incubação adequado para a quantificação da atividade enzimática da redutase do nitrito, isto é, um intervalo em que a curva de consumo de nitrito variasse linearmente em função do tempo do ensaio. Para além disto, foi também necessário otimizar a diluição de extrato proteico a utilizar nestes ensaios. Deste modo, testaram-se diluições dos extratos entre 1:1 e 1:1000 e 1:1 e 1:100 para nitrato e sulfato, respetivamente, tendo-se otimizado uma concentração de aproximadamente 0,03 mg/mL para nitrato e 0,25 mg/mL para sulfato. Note-se que devido à menor atividade de NiR nos extratos de sulfato, o que será discutido mais à frente nesta tese, foi necessário a utilização de concentrações mais elevadas destes extratos comparativamente aos de nitrato. Na

Figura 3.7 estão representadas as curvas de atividade da redutase do nitrito ao longo do tempo para os extratos proteicos das células crescidas em nitrato e sulfato, respetivamente.

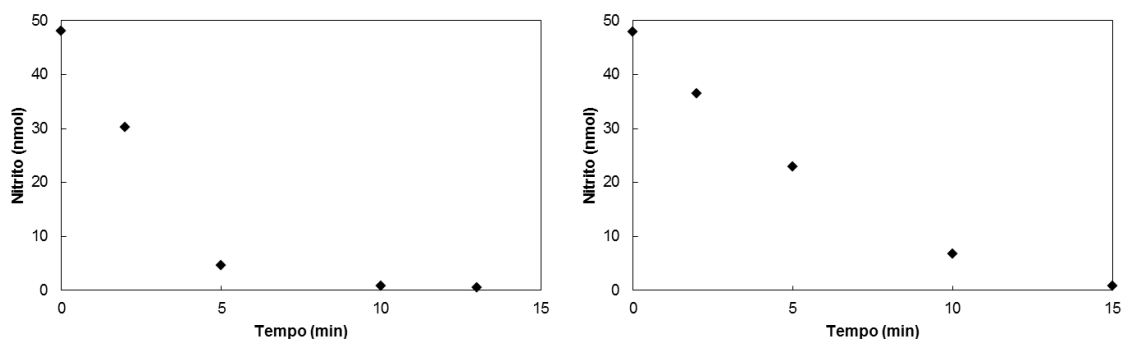


Figura 3.7: Curvas de atividade da redutase do nitrito ao longo do tempo em células de *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato (A) e em meio contendo sulfato (B). Os ensaios foram realizados a 37°C com uma mistura reacional contendo 0,5 mM de MV como mediador, 0,5 mM de nitrito de sódio como substrato em tampão fosfato pH 7,6; extrato proteico células crescidas em meio contendo nitrato (0,03 mg/mL) e sulfato (0,25 mg/mL) e 0,8 mM de ditonito de sódio como reagente redutor.

Como se pode observar na

Figura 3.7, a atividade da redutase do nitrito é bastante superior nos extratos proteicos das células de *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato (A), em comparação com as células crescidas em meio contendo sulfato (B), uma vez que há um maior consumo de nitrito. Ou seja, após aproximadamente 6 minutos de reação, todo o nitrito disponível no meio foi consumido. Já nos extratos crescidos em meio contendo sulfato, o consumo não foi tão acentuado, pois somente após 15 minutos de reação é que se deu consumo total do nitrito. Como tal, nos ensaios realizados posteriormente com os extratos em meio contendo nitrato, o tempo de incubação foi de 4 minutos, enquanto que nos em meio contendo sulfato se incubou durante 5 minutos. Estes períodos de incubação garantem assim que a curva de consumo de nitrito varie linearmente em função do tempo de ensaio.

3.1.4.2 Atividade da Redutase do Nitrito

Na Tabela 3.4 encontram-se os valores de atividade da redutase do nitrito nos extratos proteicos de células de *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato ou sulfato, as quais foram calculadas em termos de conteúdo total de proteína.

Tabela 3.4: Valores de atividade da redutase do nitrito em extratos proteicos de células de *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato e sulfato. * 1 U = 1 μ mol nitrito consumido por minuto

Amostras de Extratos		Atividade específica (mU/mg)*
Proteicos		
Nitrato	1	1250
	2	201
	3	659
Sulfato	1	66
	2	45
	3	29

De acordo com os valores apresentados na Tabela 3.4, é possível observar que a atividade da redutase do nitrito é cerca de 15 vezes mais elevada nos extratos proteicos de células crescidas em meio contendo nitrato do que em sulfato. Este resultado deve-se ao facto de muito embora as enzimas envolvidas na via de redução do nitrato serem expressas constitutivamente em *D. desulfuricans*, a presença de nitrato induz uma maior expressão desta via.^{105,107,108} Por outro lado, verifica-se que os valores variam bastante entre os três replicados biológicos de cada condição. Isto pode dever-se a alguns erros de manipulação na fase de recolha das células (dias diferentes, erros de operador). Estudos realizados anteriormente, com recurso ao método de Griess, revelaram valores de atividade da 46 U/mg para ccNiR em frações membranares obtidas a partir de extratos proteicos de células de *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato³⁶, cerca de 70 vezes superiores aos valores obtidos no presente trabalho. Esta diferença deve-se ao facto de neste trabalho se ter medido a atividade da enzima em extratos proteicos totais, o que significa que a atividade da redutase do nitrito é medida relativamente a uma quantidade de proteínas maior das que existem na fração membranares.

3.1.4.3 Ensaios de Atividade em Géis de Poliacrilamida Nativos

Com o intuito de obter uma avaliação qualitativa, mas diretamente associável às enzimas redutase do nitrato e do nitrito, realizaram-se géis nativos com os extratos proteicos de *D. desulfuricans* crescidos em meio contendo nitrato e sulfato e, para efeitos de controlo, com a enzima (ccNiR) previamente purificada. Os géis foram incubados em três soluções diferentes: 1) sem substrato; 2) com nitrito de sódio como substrato e 3) com nitrato de sódio como substrato. Os resultados encontram-se representados nas Figuras 3.8, 3.9 e 3.10.

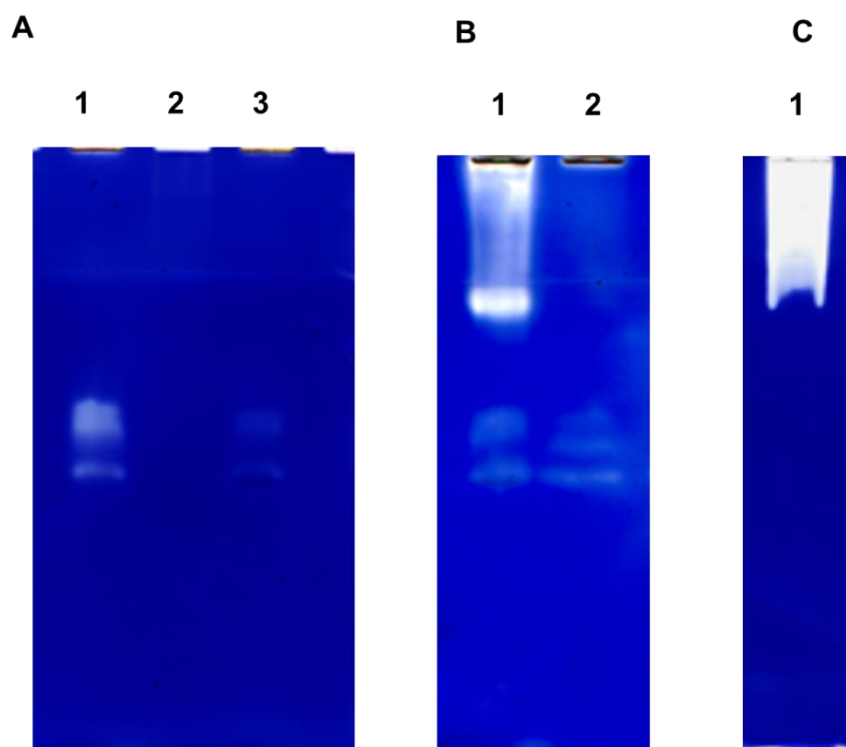


Figura 3.8: Géis de atividade de redutase do nitrito nos extratos proteicos de células *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo sulfato ou nitrato. Gel A – controlo sem substratos; A1 – células crescidas em meio contendo nitrato, A2 – ccNiR pura, A3 – células crescidas em meio contendo de sulfato. Géis B e C – incubação com nitrito de sódio; B1 – células crescidas em meio contendo nitrato, B2 – células crescidas em meio contendo de sulfato, C1 – ccNiR pura. Foram aplicadas 8,4 µg de cada extrato proteico e 10 µg de ccNiR. O gel A foi corado com uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato pH 7,6, 0,6 mM de MV e 6 mM de ditionito de sódio. Os géis B e C foram corados com uma solução igual à anterior com 20 mM de nitrito de sódio como substrato. Os géis foram incubados durante 10 minutos. Géis de poliacrilamida nativos (12,5%) [imagens obtidas a partir do software MagicScan 32 v5.0]

A atividade da redutase do nitrito (ou nitrato) pode ser identificada pelo aparecimento de uma mancha incolor nos géis corados com o viologénio de metilo reduzido (que confere a tonalidade azul ao gel), como é possível observar no gel C da Figura 3.8 (ccNiR pura incubada com nitrito). Esta mancha incolor indica que a enzima imobilizada nessa zona do gel utiliza o

viologénio de metilo reduzido como co-substrato na sua reação de redução do nitrito (ou nitrato). O esquema da reação está representado na secção 2.1.10.

Como se pode visualizar no gel A da Figura 3.8, não houve qualquer atividade da redutase do nitrito nos diferentes poços, visto que foram incubados numa solução sem substrato. Contudo, no gel B, pode-se observar a existência de atividade da redutase do nitrito tanto nos extratos de células e *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato e sulfato.

Tal como nos ensaios em solução, confirma-se que as células de *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo nitrato possuem uma atividade superior às de sulfato, uma vez que é onde a enzima é expressa em maior quantidade. Foi ainda possível detetar duas bandas que se encontram abaixo da banda atribuída à ccNiR nos poços correspondentes aos extratos nos géis A e B. Estas devem-se provavelmente à redução de outra proteínas pelo viologénio de metilo, ou seja, devem-se a um consumo não específico de viologénio de metilo, não relacionado com a redução do nitrito, como comprovado pelo seu aparecimento no gel de controlo (Figura 3.8 (A)).

Fez-se ainda uma tentativa de visualização da atividade da redutase do nitrato tendo-se utilizado para tal um gel nativo corado com uma solução que continha nitrato de sódio como substrato (Figura 3.9).

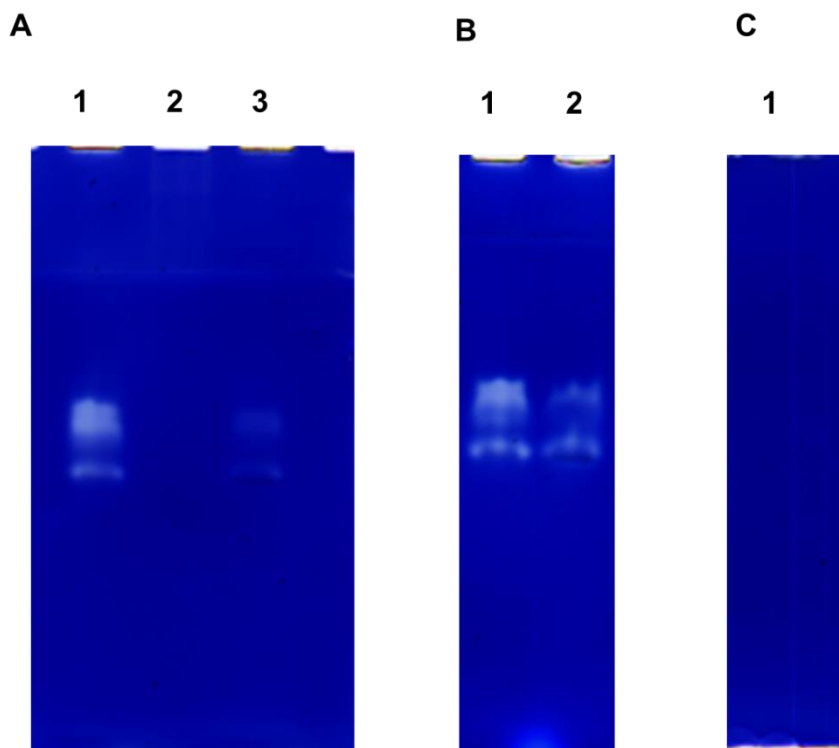


Figura 3.9: Géis de atividade de redutase do nitrato nos extratos proteicos de células *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo sulfato ou nitrato. Gel A - controlo sem substratos; A1 - células crescidas em meio contendo nitrato, A2 – ccNiR, A3 – células crescidas em meio contendo de sulfato. Géis B e C – incubação com nitrato de sódio; B1 – células crescidas em meio contendo nitrato, B2 – células crescidas em meio contendo de sulfato, C1 – ccNiR pura. Foram aplicadas 8,4 µg de cada extrato proteico e 10 µg de ccNiR. O gel A foi corado com uma solução contendo 100 mM de tampão fosfacto pH 7,6, 0,6 mM de MV e 6 mM de ditionito de sódio. Os géis B e C foram corados com uma solução igual à anterior com 100 mM de nitrato de sódio como substrato. Os géis foram incubados durante 10 minutos. Géis de poliacrilamida nativos (12,5%) [imagens obtidas a partir do software MagicScan 32 v5.0]

Nos géis de atividade de redutase do nitrato (Figura 3.9), ao fim de 10 minutos de incubação, apenas foi possível identificar as duas bandas correspondentes à ligação inespecífica do viologénio de metilo a proteínas não envolvidas na redução de nitrato ou nitrito, já observadas nos géis A e B da Figura 3.8. O poço do gel C corresponde à ccNiR pura incubada numa solução contendo nitrato como substrato, e como tal é normal a não visualização de qualquer banda. Pelo contrário, esperava visualizar-se atividade da redutase do nitrato nos extratos proteicos totais de células *D. desulfuricans*, crescidas em meio contendo nitrato (B1) e sulfato (B2), uma vez que as amostras devem conter todas as enzimas responsáveis pela redução dissimilativa do nitrato (tendo-se já identificado a presença da redutase do nitrito), o que não aconteceu nas condições inicialmente testadas (semelhantes às usadas para a ccNiR). Isto não é totalmente inesperado, uma vez que o k_{cat} (23 s^{-1}) e o K_M (32 µM) da Nap são bastantes inferiores aos parâmetros cinéticos da NiR ($k_{cat} = 738 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 15 \text{ µM}$).^{109,110} Como tal, os géis de atividade foram deixados a incubar na mesma solução (com nitrato de sódio como substrato) por um período de tempo mais alargado (Figura 3.10)

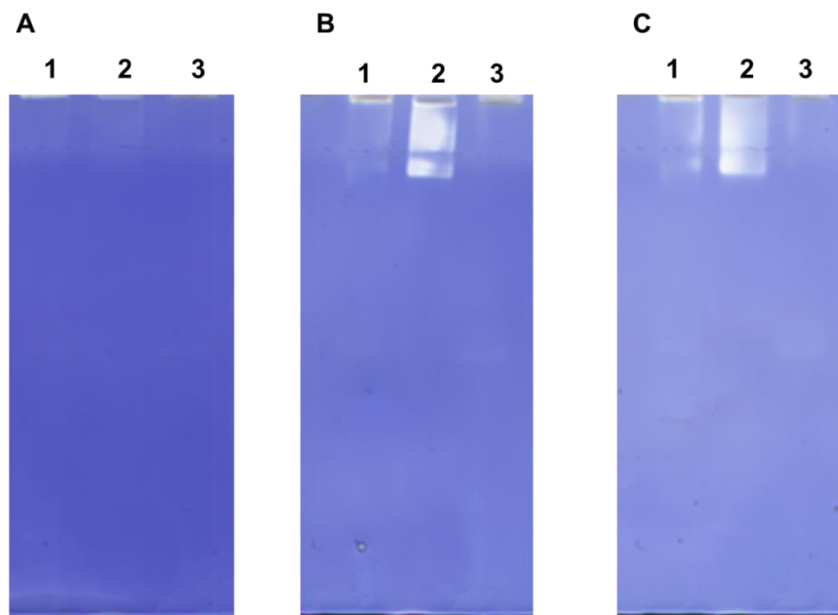


Figura 3.10: Géis de atividade de redutase do nitrato nos extratos proteicos de células *D. desulfuricans* crescidas em meio contendo sulfato ou nitrato. Gel A – incubação com nitrato de sódio durante 10 minutos; A1 – células crescidas em meio contendo nitrato, A2 – ccNiR pura, A3 – células crescidas em meio contendo de sulfato. Gel B – incubação com nitrato de sódio durante 15 minutos; B1 – células crescidas em meio contendo nitrato, B2 – ccNiR pura, B3 - células crescidas em meio contendo de sulfato. Gel C – incubação com nitrato de sódio durante 20 minutos; C1 – células crescidas em meio contendo nitrato, C2 – ccNiR pura, C3 - células crescidas em meio contendo de sulfato. Foram aplicadas 8,4 µg de cada extrato proteico e 10 µg de ccNiR. Os géis foram corados com uma solução contendo 100 mM de tampão fosfacto pH 7,6, 0,6 mM de MV, 100 mM de nitrato de sódio e 6 mM de ditionito de sódio. Géis de poliacrilamida nativos (12,5%) [imagens obtidas a partir do software MagicScan 32 v5.0]

Efetivamente, tal como se pode ver nos géis da Figura 3.10, observa-se uma banda de atividade de redutase do nitrato em ambos os extratos (nitrato e sulfato) que vai aumentando de intensidade ao longo do tempo. Note-se que, como esperado, a atividade é muito superior na amostra de nitrato comparativamente à amostra de sulfato. Contudo, é importante salientar que a atividade da redutase do nitrato localiza-se na mesma zona do gel onde se visualizou a atividade da redutase do nitrito, o que poderá indicar que o gel nativo não permitiu fazer uma separação eficiente das duas proteínas. Ou seja, uma vez que os extratos proteicos devem conter as duas enzimas (redutase do nitrito e nitrato), à medida que a Nap converte o nitrato em nitrito este poderá ser imediatamente consumido e convertido a amónia pela ccNiR; consequentemente, esta atividade poderá sobrepor-se à da redutase do nitrato. Todavia, se assim for, este resultado prova igualmente a presença da Nap em ambos os extratos, muito embora não se possa comparar diretamente a sua actividade.

3.2 Actinobactérias Marinhas

3.2.1 Quantificação de Proteína

Como referido anteriormente, é importante quantificar a proteína de maneira a aplicar sempre a mesma quantidade de proteína total nas *strips*. A quantificação das amostras das actinobactérias *S.arenicola* e *S.pacifica* foi realizada com o *kit BioRad Protein Assay*, baseado no método de Bradford e por *2D Quant Kit* da GE. Na Figura 3.11 estão apresentadas as curvas de calibração obtidas pelos diferentes métodos.

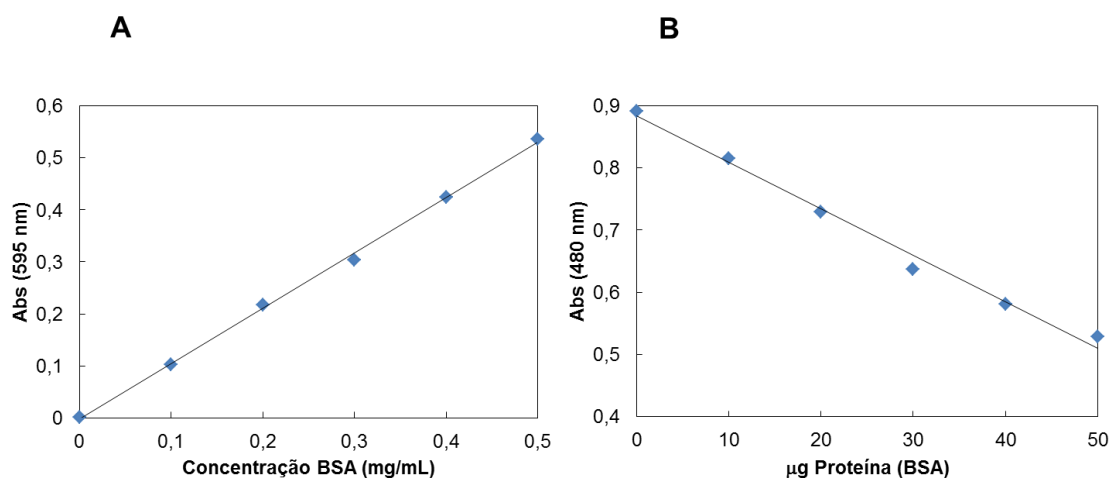


Figura 3.11: Curvas de calibração utilizadas para a quantificação das amostras das actinobactérias *S. arenicola* e *S.pacifica* pelo (A) método de Bradford ($y = 1,064x - 0,002$; $r^2 = 0,999$) e (B) pelo método de *2D Quant Kit* ($y = -0,007x + 0,884$; $r^2 = 0,990$). A proteína utilizada como padrão foi BSA. Em ambos os gráficos os valores correspondem à média de duplicados.

Tal como foi descrito anteriormente, o *kit BioRad Protein Assay* é baseado no método de Bradford. Neste, monitoriza-se o valor de absorvância a 595 nm que corresponde ao máximo de absorvância do reagente *Coomassie Brilliant Blue G 250* ligado às proteínas, mais especificamente a resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos, especialmente a arginina. A concentração da proteína é diretamente proporcional à absorvância e, por isso, o declive das retas de ajuste às curvas de calibração é positivo. Relativamente aos gráficos das figuras 3.10, que correspondem às curvas de calibração obtidas pelo método *2D Quant kit*, fundamentado na ligação dos iões cobre às proteínas, o parâmetro medido no ensaio espectrofotométrico é o cobre não ligado às proteínas. Assim, a concentração da proteína é inversamente proporcional à absorvância, e como tal, o declive das curvas são negativos.

Os valores da concentração de proteína total das amostras de *S. arenicola* e *S. pacifica* foram obtidos a partir da equação das curvas de calibração e encontram-se representados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Valores de concentração de proteína total das amostras de células das actinobactérias *S. arenicola* e *S. pacifica*. (estes valores correspondem à média de duas leituras independentes)

Amostras	Concentração (mg/mL)	Concentração (mg/mL)
	<i>BioRad Protein Assay</i>	<i>2D Quant kit</i>
<i>S. arenicola</i>	3,7 ± 0,1	3,54 ± 0,03
<i>S. pacifica</i>	7,1 ± 0,6	6,6 ± 0,6

Pela análise da tabela, é possível verificar que os valores não diferenciam muito de método para método, sendo que se observam erros maiores quando a quantificação é realizada pelo método *2D Quant Kit*. Como referido na secção 3.1.2, isto podem dever-se a erros de pipetagem, assim como à constante manipulação das amostras o que pode levar à perda de proteína. Neste contexto, escolheu-se igualmente o método de Bradford como o preferencial para quantificar proteína total. É importante referir que a amostra correspondente à actinobactéria *S. arenicola* encontra-se menos concentrada quando comparada com a amostra das células de *S. pacifica*. Isto poderá estar relacionado com diferenças nas condições de crescimento das células, visto ter ocorrido em alturas distintas e também às dificuldades experimentais em diminuir a viscosidade das células antes de serem partidas pela prensa francesa.

3.2.2 Eletroforese 2D

As células das actinobactérias (*S. arenicola* e *S. pacífica*) isoladas e purificadas a partir de sedimentos marinhos foram lisadas e seus extratos proteicos foram analisados através de electroforese bidimensional. Os proteomas encontram-se representados nas Figuras 3.12 e 3.13.

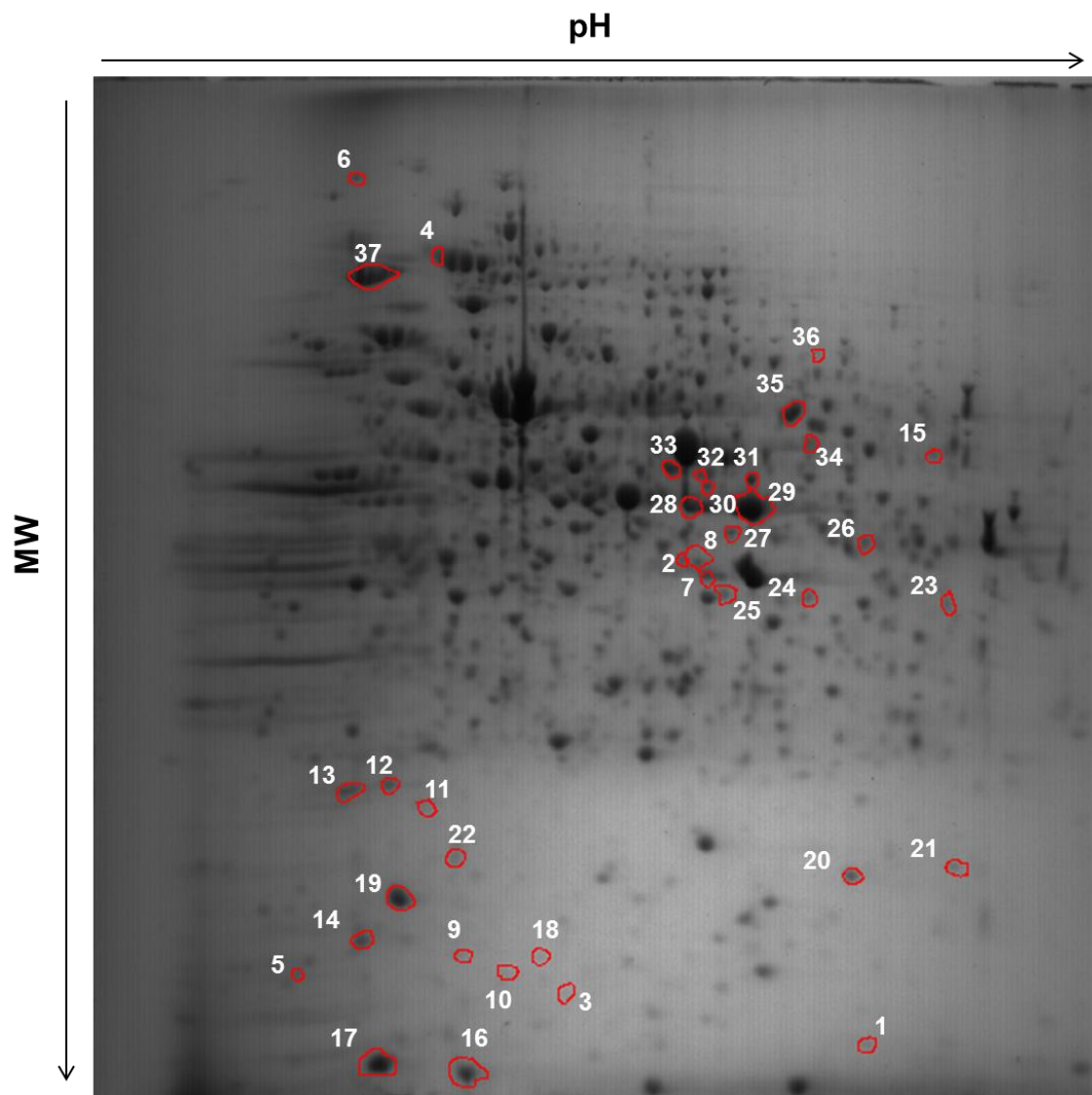


Figura 3.12: Mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *S. arenicola*. As proteínas foram separadas em *strips* de 13 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul *coomassie* coloidal. Os *spots* representados correspondem aos *spots* de proteínas comuns [imagem obtida no software *Melanie 7.0*]

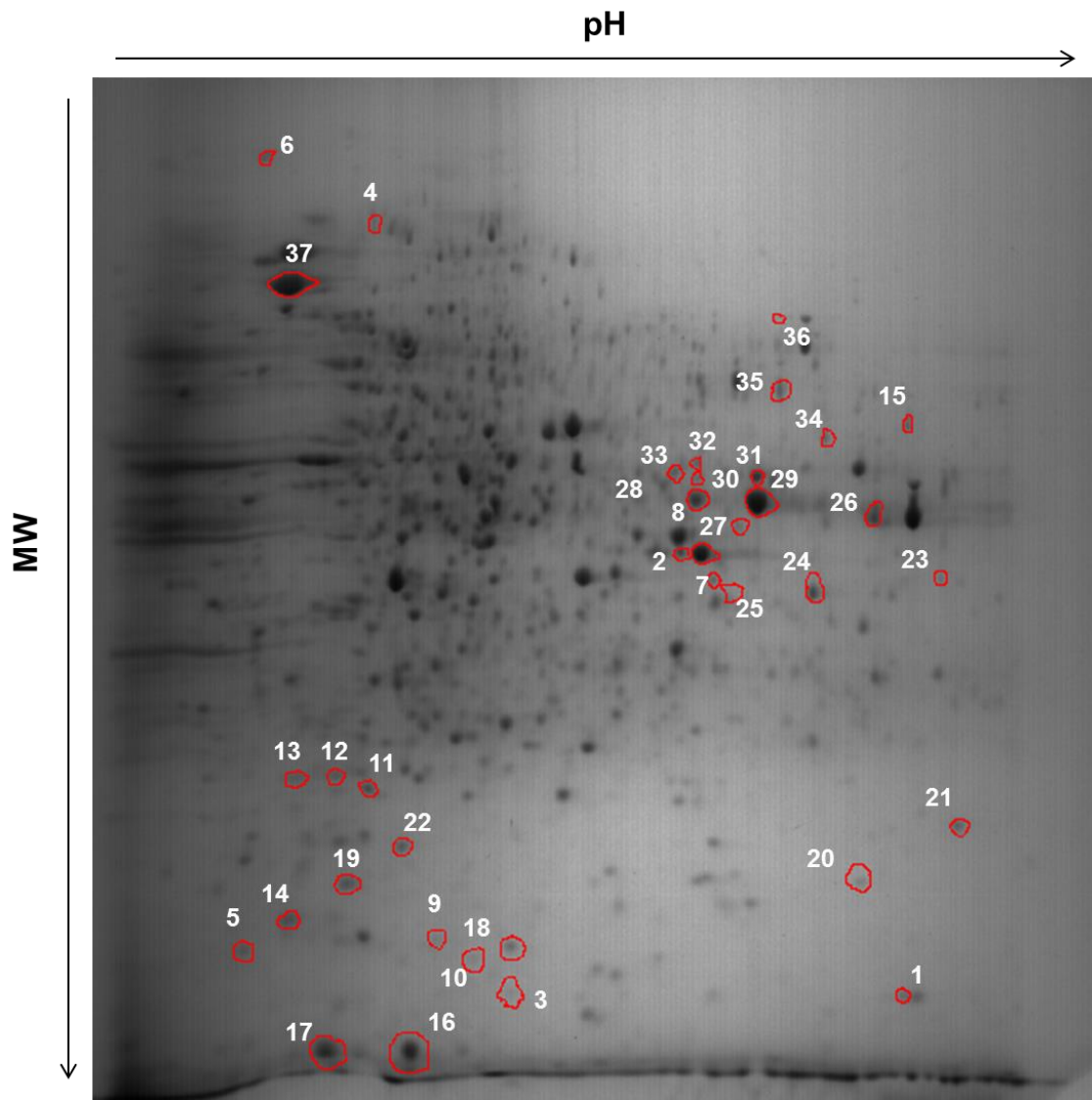


Figura 3.13: Mapa de gel 2D do extrato proteico total de células de *S. pacífica*. As proteínas foram separadas em *strips* de 13 cm de pH 4 - 7 seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5 % de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os *spots* representados correspondem aos *spots* de proteínas comuns [imagem obtida no software Melanie 7.0.]

Pela observação preliminar dos proteomas pode-se verificar uma diferença bastante acentuada no perfil dos géis de *S. arenicola* e *S. pacífica*. Contudo, em ambos os casos existe uma grande quantidade de *spots* com massa molecular relativa elevada e na gama de pH 5 - 7. Para além disso, na zona mais ácida do gel observa-se a existência de riscos (*streaks*) horizontais, que podem ter sido resultado ou de uma má solubilização da amostra ou da presença de impurezas.

Através da análise das imagens dos géis com o software *Melanie 7.0* detetaram-se 650 *spots* no gel da amostra PTM - 99 (*S. arenicola*) e 510 no gel da amostra PTM - 93 (*S. pacífica*). Estes valores correspondem à média dos triplicados técnicos para cada amostra. Uma vez que os

perfis proteicos das duas actinobactérias apresentam bastantes diferenças, não foi possível realizar a validação estatística de *spots* diferenciais. Esta observação é bastante interessante, visto que estas espécies possuem uma semelhança de 99% de acordo com a análise da sequência 16S rRNA. Neste caso, optou-se por verificar a existência de *spots* comuns entre os géis de cada amostra. Assim, após o alinhamento e *matching* dos géis identificaram-se 37 *spots* de proteína com a mesma massa molecular e ponto isoeletrico. Estes *spots* comuns a ambas as amostras são possíveis candidatos a biomarcadores (PKSs e NRPSs) responsáveis pela síntese de metabolitos secundários.

Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas

Futuras

4 Conclusões e Perspetivas Futuras

Esta dissertação dividiu-se em duas partes, a primeira das quais se focou no estudo das ferramentas metabólicas responsáveis pela flexibilidade respiratória da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 induzidas por diferentes aceitadores finais de eletrões. Na segunda parte deste trabalho, estudaram-se as vias metabólicas envolvidas na produção de metabolitos bioativos de duas actinobactérias marinhas (*S. arenicola* e *S. pacifica*). Em ambos os estudos, realizou-se uma análise proteómica baseada na técnica 2DE.

Relativamente às BRS, as células foram crescidas em condições anaeróbias e a 37 °C (temperatura ótima para o crescimento desta espécie), tendo-se registado um crescimento mais rápido e a obtenção de uma maior massa celular no meio contendo nitrato relativamente ao meio com sulfato. Isto pode ser devido ao facto do nitrato ser um aceitador de eletrões termodinamicamente mais favorável, bem como a alguns dos sub-produtos do metabolismo do sulfato (p.e. H₂S) poderem ser tóxicos para as células e assim inibir o seu crescimento nas condições utilizadas neste trabalho (sistema *batch*, anaeróbio, sem renovação de fase gasosa). As células de *D. desulfuricans* foram recolhidas às 16h, o que corresponde à fase estacionária do crescimento, tendo depois sido lisadas e quantificadas. Apesar da proporção biomassa/volume ter sido mantida nas duas condições estudadas (nitrato vs sulfato), as concentrações de proteína total das duas amostras (nitrato vs sulfato) foram diferentes, sendo que as células crescidas em meio contendo nitrato se encontravam bastante mais concentradas.

Os extratos proteicos totais das células de *D. desulfuricans* foram então analisados por 2DE num gradiente de pH 4 - 7, tendo-se observado cerca de 600 *spots* para o gel de nitrato e 500 *spots* para o gel de sulfato. Esta diferença de aproximadamente 100 *spots* deve-se aos efeitos dos diferentes substratos oxidantes na expressão proteica. Concretamente, propõe-se que as células crescidas em meio contendo sulfato expressam apenas as proteínas necessárias para o seu metabolismo base, uma vez que se encontram no seu meio “ideal”. Por outro lado, em virtude da necessidade de adaptação à diferente condição de crescimento, as células crescidas em meio contendo nitrato têm de expressar proteínas de mecanismos adicionais. De seguida, foi realizada uma análise estatística dos proteomas em que foi possível identificar 42 *spots* diferenciais entre os dois géis 2D, entre os quais, 20 se encontravam *overexpressed* no meio contendo sulfato. A existência de uma percentagem elevada de *spots* diferenciais, associado ao já referido número de *spots* presentes apenas numa das condições levou-nos a concluir que os diferentes substratos respiratórios têm consequências importantes na composição celular de *D. desulfuricans* (25%), afetando consideravelmente os níveis de expressão de um número significativo de proteínas, as quais importam identificar. Contudo, sabe-se que as redutases do nitrato e do nitrito são expressas

em quantidades mais elevadas quando o nitrato é utilizado como substrato respiratório. Assim as atividades da redutase do nitrito e do nitrato dos extratos proteicos de *D. desulfuricans* foram determinadas por ensaios em solução e em géis de poliacrilamida com separação por eletroforese nativa. Nos ensaios em solução, observou-se uma maior atividade da redutase do nitrito nas células crescidas em nitrato do que em sulfato (entre 600 - 1000 e 30 - 60 mU/mg, respetivamente). Nos ensaios em gel a atividade foi avaliada qualitativamente por uma mera inspeção visual. Foi possível então concluir que existe atividade da redutase do nitrito nas células crescidas em meio nitrato e sulfato, sendo mais elevada no primeiro caso. Em relação à redutase do nitrato, observou-se uma banda de atividade pouca intensa em ambos os extratos (nitrato e sulfato) que foi aumentando de intensidade ao longo do tempo de incubação do gel. Mais uma vez, a atividade enzimática foi maior nas amostras de células crescidas em meio contendo nitrato. A presença de uma maior atividade das duas enzimas (NiR/Nap) nos extratos de nitrato era expectável, uma vez que as vias de redução do nitrato serão favorecidas na presença deste composto. Por outro lado, sabe-se que algumas proteínas da via de redução do nitrato são expressas constitutivamente, mesmo quando a bactéria é crescida em sulfato, o que justifica que haja alguma atividade neste extrato, embora claramente inferior.^{105,107,108}

Futuramente, o passo seguinte consistirá na identificação por espetrometria de massa das proteínas expressas diferencialmente na presença de nitrato e sulfato. Esta informação será fundamental para a compreensão do respiroma de *D. desulfuricans* ATCC 27774, mais concretamente as vias metabólicas e mecanismos de regulação responsáveis pela flexibilidade respiratória desta bactéria pela sua elevada capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. Um outro objetivo futuro deste trabalho será a validação dos resultados que se obtiveram por eletroforese 2D utilizando técnicas de transcriptómica. Desta forma, pretendem estudar-se as alterações a nível de expressão genética nas células de *D. desulfuricans* quando crescidas em diferentes substratos oxidantes. Para além disso, pretende-se obter mais resultados utilizando outras gamas de pH (3 - 5 e 6 - 11). Em relação aos ensaios enzimáticos, poderão ser realizados estudos de atividade das enzimas envolvidas na redução dissimilativa do sulfato, tais como a redutase do APS, a sulfurilase do ATP e a redutase dissimilativa do sulfito.¹¹¹⁻¹¹³

Na segunda parte deste trabalho, os extratos proteicos totais de *S. arenicola* e *S. pacifica* foram analisados por 2DE em *strips* de IPG de 13 cm, pH 4 - 7. Através da análise dos géis 2D, foram observados cerca de 650 *spots* no gel correspondente à *S. arenicola* e 510 *spots* do gel de *S. pacifica*. Os perfis proteicos destas duas espécies eram bastante distintos, o que não era previsível, uma vez que elas partilham 99% de identidade de acordo com a análise da sequência 16S rRNA. No entanto, foi ainda assim possível identificar 37 *spots* comuns entre os dois géis. Como trabalho futuro pretendem-se identificar estas proteínas recorrendo-se para tal à técnica de espetrometria de massa. Esta informação será avaliada em conjunto com os dados relativos ao genoma e à produção de compostos bioativos por estas espécies (trabalho em desenvolvimento).

com o grupo da Doutora Susana Gaudêncio). Para além disso, pretende-se continuar o estudo com filotipos diferentes de *Salinispora*, e também com espécies do mesmo filotipo. Este trabalho permitirá estabelecer relações entre o perfil de bioatividade de actinobactérias marinhas e suas características genoma / proteoma / metaboloma. Desta forma poder-se-á contribuir para a entendimento das vias moleculares que controlam a síntese de metabolitos bioativos alvo e eventual otimização da sua produção para utilização comercial, nomeadamente na indústria farmacêutica.

Capítulo 5 - Referências Bibliográficas

5 Referências Bibliográficas

1. Muyzer, G. & Stams, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 441–54 (2008).
2. Fauque, G. in *Sulphate-Reducing Bact.* (1995).
3. Martins, C.R. e Andrade, J. B. Química Atmosférica do Enxofre (IV): emissões, reações em fase aquosa e impacto ambiental. *Quim.Nova* **25**, 259–272 (2002).
4. Widdel, F. in *Biol. Anaerob. Microorg.* (1988).
5. Ontiveros-valencia, A. *et al.* Interactions between Nitrate-Reducing and Sulfate-Reducing Bacteria Coexisting in a Hydrogen-Fed Bio film. *Environ. Sci. Tecnol.* **46**, 11289-11298 (2012).
6. Bradley, a S., Leavitt, W. D. & Johnston, D. T. Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway. *Geobiology* **9**, 446–57 (2011).
7. Dahl, C and Friedrich, C. G. *Microbial Sulfur Metabolism.* (2008).
8. Ramos, A. R., Keller, K. L., Wall, J. D. & Pereira, I. A. C. The Membrane QmoABC Complex Interacts Directly with the Dissimilatory Adenosine 5'-Phosphosulfate Reductase in Sulfate Reducing Bacteria. *Front. Microbiol.* **3**, 137 (2012).
9. Shen, Y. & Buick, R. The antiquity of microbial sulfate reduction. *Earth-Science Rev.* **64**, 243–272 (2004).
10. Gavel, O. Y. *et al.* ATP sulfurylases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. A novel metalloprotein containing cobalt and zinc. *Biochemistry* **37**, 16225–32 (1998).
11. Ullrich, T. C., Blaesie, M. & Huber, R. Crystal structure of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*, a key enzyme in sulfate activation. *EMBO J.* **20**, 316–29 (2001).
12. Meyer, B. & Kuever, J. Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes--origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**, 2026–44 (2007).
13. Peck, H. Enzymatic basis for assimilatory and dissimilatory sulfate reduction. *J. Bacteriol.* 933–939 (1961).
14. Meyer, B. & Kuever, J. Homology modeling of dissimilatory APS reductases (AprBA) of sulfur-oxidizing and sulfate-reducing prokaryotes. *PLoS One* **3**, e1514 (2008).
15. Kremer, D. *et al.* Immunocytochemical localization of APS reductase and bisulfite reductase in three *Desulfovibrio* species. *Arch. Microbiol.* **150**, 296–301 (1988).
16. Schiffer, A. *et al.* Structure of the dissimilatory sulfite reductase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J. Mol. Biol.* **379**, 1063–74 (2008).

17. Pereira, I. a C. *et al.* A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. *Front. Microbiol.* **2**, 69 (2011).
18. Richardson, D. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology.* **146**, 551–571 (2000).
19. Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. in *Brock Biology of microorganisms* (2012).
20. Teixeira, C. F. C. Desnitrificação em sedimentos subtidais do estuário do rio Douro. (2005).
21. Kraft, B., Strous, M. & Tegetmeyer, H. E. Microbial nitrate respiration--genes, enzymes and environmental distribution. *J. Biotechnol.* **155**, 104–17 (2011).
22. González, P. J. Periplasmic nitrate reductases: structural and spectroscopic studies. (2006).
23. González, P. J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C. D. & Moura, J. J. G. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 1015–23 (2006).
24. Cabello, N., Marti, M., Moreno-vivia, C., Blasco, R. & Castillo, F. MINIREVIEW Prokaryotic Nitrate Reduction : Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. *J. Bacteriol.* **181**, 6573–6584
25. Morozkina, E. V & Zvyagilskaya, R. a. Nitrate reductases: structure, functions, and effect of stress factors. *Biochem. Biokhimiia* **72**, 1151–60 (2007).
26. Einsle, O. Structure and function of cytochrome c nitrite reductase. 1999.Tese (Doutorado em Ciências Naturais) Faculdade de Biologia. Universidade de Konstanz. Konstanz
27. Liu, M. C. & Peck, H. D. The isolation of a hexaheme cytochrome from *Desulfovibrio desulfuricans* and its identification as a new type of nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* **256**, 13159–64 (1981).
28. Simon, J., Gross, R. & Einsle, O. A NapC/NirT-type cytochrome c (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome c nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*. *Mol. Microbiol.* **35**, 686–696 (2000).
29. Einsle, O. Structure and function of formate-dependent cytochrome c nitrite reductase, NrfA. *Methods Enzymol.* **496**, 399–422 (2011).
30. Almeida, M. G. *et al.* The isolation and characterization of cytochrome c nitrite reductase subunits (NrfA and NrfH) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3904–3915 (2003).
31. Cypionka, H. Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 827–48 (2000).
32. Moura, I., Bursakov, S., Costa, C. & Moura, J. Nitrate and nitrite utilization in sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe.* **3**, 279–290 (1997).
33. Postgate, J.R. and Campbell, L. L. Classification of *Desulfovibrio* Species, the Nonsporulating Sulfate-reducing Bacteria. *Bacteriol. Rev.* **30**, 732–738 (1966).

34. Holt, J. in *Bergey's manual of determinative bacteriology*. (1994).
35. Fournier, M. *et al.* Response of the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to oxidative conditions: proteome and transcript analysis. *Biochimie* **88**, 85–94 (2006).
36. Lobo, S. a L., Melo, A. M. P., Carita, J. N., Teixeira, M. & Saraiva, L. M. The anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 grows at nearly atmospheric oxygen levels. *FEBS Lett.* **581**, 433–6 (2007).
37. Castro, H., Williams, N. & Ogram, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**, 1–9 (2000).
38. Ben-Dov, E., Brenner, A. & Kushmaro, A. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. *Microb. Ecol.* **54**, 439–51 (2007).
39. S. J. Hockin and G. M. Gadd, "Bioremediation of metals and metalloids by precipitation and cellular binding," in in *Sulphate-Reducing Bacteria-Environmental and engineered systems* (2007).
40. Zhang, W., Culley, D. E., Hogan, M., Vitiritti, L. & Brockman, F. J. Oxidative stress and heat-shock responses in *Desulfovibrio vulgaris* by genome-wide transcriptomic analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* **90**, 41–55 (2006).
41. Genevau, P. S. . Sulfate-Reducing Bacteria in Human Periodontitis.
42. Warren, Y. & Citron, D. Biochemical differentiation and comparison of *Desulfovibrio* species and other phenotypically similar genera. *J. Clin. Microbiology.* **43**, 4041–4045 (2005).
43. Liu, M. C. *et al.* Cytochrome components of nitrate- and sulfate-respiring *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *J. Bacteriol.* **170**, 5545–51 (1988).
44. Da Silva, S. M., Pacheco, I. & Pereira, I. a C. Electron transfer between periplasmic formate dehydrogenase and cytochromes c in *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *J. Biol. Inorg. Chem.* **17**, 831–8 (2012).
45. Gavel, O. Y. *et al.* Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of adenosine triphosphate sulfurylase (ATPS) from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 593–5 (2008).
46. Carneiro, C. & Moura, J. J. G. Biogeciclos: uma visão molecular das enzimas e dos mecanismos envolvidos nos ciclos dos elementos.
47. Morse, R., Gibson, G. R. & Collins, M. D. Secondary structure analysis of the dissimilatory sulphite reductase in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Letters in Applied Microbiology.* **30**, 375–378 (2000).
48. Dias, J. M. *et al.* Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods. *Structure* **7**, 65–79 (1999).

49. Cunha, C. a *et al.* Cytochrome c nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. The relevance of the two calcium sites in the structure of the catalytic subunit (NrfA). *J. Biol. Chem.* **278**, 17455–65 (2003).
50. Gilmore, J., Washburn, M. P. Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. *J. Proteomics*. **73**, 2078–2091 (2010).
51. Almeida, M. G., Rodrigues, C. & Lampreia, J. Proteomas: a interface entre a biologia molecular e a bioquímica das proteínas. 49–56 (2001).
52. Rabiloud, T. & Lelong, C. Two dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *J. Proteomics*. **74**, 1829–1841 (2011).
53. Gorg, A. *2-D Electrophoresis - Principles and Methods*. (2004).
54. Zhang, W. *et al.* A proteomic view of *Desulfovibrio vulgaris* metabolism as determined by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Proteomics* **6**, 4286–99 (2006).
55. Redding, A. M., Mukhopadhyay, A., Joyner, D. C., Hazen, T. C. & Keasling, J. D. Study of nitrate stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough using iTRAQ proteomics. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **5**, 133–43 (2006).
56. Lilja, T. Isolating microorganisms from marine and marine-associated samples – A targeted search for novel natural antibiotics. (2013).
57. Subramani, R. & Aalbersberg, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* **167**, 571–580 (2012).
58. Zhao, X. Genome-Based Studies of Marine Microorganisms to Maximize the Diversity of Natural Products Discovery for Medical Treatments. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2011**, 1–11 (2011).
59. Bull, A., Stach, J., Ward, A. & Goodfellow, M. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **87**, 65–79 (2005).
60. Dhananjeyan, V., Selvan, N. & Dhanapal, K. Isolation, Characterization, Screening and Antibiotic Sensitivity of Actinomycetes from Locally(Near MCAS) Collected Soil Samples. *J. Biol. Sciences.* **10**, 514–519 (2010).
61. Goodfellow, M. & Williams, S. T. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 189–216 (1983).
62. Ventura, M. *et al.* Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 495–548 (2007).
63. Greenblatt, C. L. *et al.* *Micrococcus luteus* - Survival in Amber.
64. Jones, D. & Keddie, R. The genus *Arthrobacter*. *The prokaryotes* 945–960 (2006).
65. Muricy, E. & Lemes, R. Differentiation between *Nocardia* spp. and *Mycobacterium* spp.: critical aspects for bacteriological diagnosis. *Rev. do Inst. Med.Trop.* **56**, 397–401 (2014).

66. Coombs, J. & Franco, C. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiology* **69**, 5603–5608 (2003).
67. Valan, A. M., Asha, K., Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S. & Agastian, P. Characterization and phylogenetic analysis of novel polyene type antimicrobial metabolite producing actinomycetes from marine sediments: Bay of Bengal India. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**, 803–10 (2012).
68. Sharma, M. Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* **3**, 801–832 (2014).
69. Lam, K. S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* **9**, 245–251 (2006).
70. Udworthy, D. W. *et al.* Significant Natural Product Biosynthetic Potential of Actinorhizal Symbionts of the Genus *Frankia*, as Revealed by Comparative Genomic and Proteomic Analyses. *Appl. Environ. Microbiology* **77**, 3617–3625 (2011).
71. Doroghazi, J. & Metcalf, W. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC Genomics* **14**, 1–13 (2013).
72. Manivasagan, P., Venkatesan, J. & Kim, S.-K. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiological Research* **168**, 311–332 (2013).
73. Warnecke, F. & Sommaruga, R. Abundances, identity, and growth state of actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Appl. Environ. Microbiology* **71**, 5551–5559 (2005).
74. Manivasagan, P. & Venkatesan, J. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiol. Research* **168**, 311–332 (2013).
75. Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. & Fenical, W. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Appl. Environ. Microbiology* **68**, 5005–5011 (2002).
76. Fenical, W. & Jensen, P. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 666–673 (2006).
77. Jensen, P. & Mafnas, C. Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. *Environ. Microbiol.* **8**, 1881–1888 (2006).
78. Ahmed, L., Jensen, P. R., Freel, K. C. & Goodfellow, B. K. M. *Salinispora pacifica* sp. nov., an actinomycete from marine sediments. *Antoine van Leeuwenhoek* **103**, 1069–1078 (2013).
79. Edlund, A., Loesgen, S., Fenical, W. & Jensen, P. R. Geographic Distribution of Secondary Metabolite Genes in the Marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *Appl. Environ. Microbiology* **77**, 5916–5925 (2011).
80. Mincer, T. J., Fenical, W. & Jensen, P. R. Culture-Dependent and Culture-Independent Diversity within the Obligate Marine Actinomycete Genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7019–7028 (2005).

81. Feling, R. & Buchanan, G. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinispora*. *Angew. Chemie*. **42**, 355–357 (2003).
82. Ahn, K. S. *et al.* Salinosporamide A (NPI-0052) potentiates apoptosis , suppresses osteoclastogenesis , and inhibits invasion through down-modulation of NF- κ B – regulated gene products. *Blood* **110**, 2286–2295 (2007).
83. Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G. & Fenical, W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antoine van Leeuwenhoek* **87**, 43–48 (2005).
84. Williams, P. G. *et al.* New Cytotoxic Salinosporamides from the Marine Actinomycete *Salinispora tropica*. *J Org Chem*. **70**, 6196–6203 (2005).
85. Jensen, P. R., Williams, P. G., Oh, D., Fenical, W. & Zeigler, L. Species-Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1146–1152 (2007).
86. Williams, P. G., Miller, E. D., Asolkar, R. N. & Jensen, P. R. Arenicolides A-C, 26-Membered Ring Macrolides from the Marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Org Chem*. **72**, 5025–5034 (2008).
87. Asolkar, R. & Kirkland, T. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin-and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Antibiot.* **63**, 37–39 (2010).
88. Oh, D. & Gontang, E. Salinipyrone and pacificanone, mixed-precursor polyketides from the marine actinomycete *Salinispora pacifica*. *J. Nat. Prod.* **71**, 1–21 (2008).
89. Bose, U. *et al.* Discovering the Recondite Secondary Metabolome Spectrum of *Salinispora* Species : A Study of Inter-Species Diversity. **9**, 1–10 (2014).
90. Penn, K., Jenkins, C., Nett, M. & Udway, D. Genomic islands link secondary metabolism to functional adaptation in marine Actinobacteria. *ISME J.* **3**, 1193–1203 (2009).
91. Bumpus, S., Evans, B. S. & Thomas, P. M. A proteomics approach to discovering natural products and their biosynthetic pathways. *Nat. Biotechnol.* **27**, 951–956 (2009).
92. Chen, Y., Ntai, I. & Ju, K. A proteomic survey of nonribosomal peptide and polyketide biosynthesis in actinobacteria. *J. proteome Res.* **11**, 85–94 (2011).
93. Gallo, G. *et al.* Differential proteomic analysis reveals novel links between primary metabolism and antibiotic production in *Amiclatopsis balhimycina*. *Proteomics* **10**, 1336–58 (2010).
94. Mot, R. De, Schoofs, G. & Nagy, I. Proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* mutants affected in the proteasome system reveals changes in stress-responsive proteins. *Arch. Microbiol.* **188**, 257–271 (2007).
95. Gallo, G. *et al.* Differential proteomic analysis of an engineered *Streptomyces coelicolor* strain reveals metabolic pathways supporting growth on n -hexadecane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 1289–1301 (2012).

96. Zinkevich, V. & Beech, I. Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**, 147–155 (2000).
97. BioRad. BioRad Protein Assay. SIG 093094.
98. Biosciences, A., 2-D Quant kit, Instructions 2-D eletrophoresis. 80-6486-22/Rev. C1/12-02.
99. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
100. Miranda, K. M., Espey, M. G. & Wink, D. A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric oxide* **5**, 62–71 (2001).
101. Yucel, A.A., Gulen, S., Dincer, S., Yucel, A. E. Comparison of two different applications of the Griess method for nitric oxide measurement. *J. Exp. Integr. Med.* **2**, 167–171 (2012).
102. Dias, T. Estudo da biodiversidade em actinobactérias marinhas, provenientes de sedimentos oceânicos colhidos no Arquipélago da Madeira. (2013).
103. Biosciences, A., 2-D Clean-Up Kit, Instructions 2-D Electrophoresis. 80-6486-60/Rev. C0/11-02 (2002).
104. Marietou, A., Griffiths, L. & Cole, J. Preferential reduction of the thermodynamically less favorable electron acceptor, sulfate, by a nitrate-reducing strain of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* 27774. *J. Bacteriol.* **191**, 882–9 (2009).
105. Seitz, H. & Cypionka, H. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* with hydrogen coupled to ammonification of nitrate or nitrite. *Arch. Microbiol.* **2**, 63–67 (1986).
106. Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S. & Lelong, C. Fully denaturing two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a critical update. *Proteomics* **8**, 3965–73 (2008).
107. Mitchell, G., Jones, J. & Cole, J. Distribution and regulation of nitrate and nitrite reduction by *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species. *Arch. Microbiol.* **144**, 35–40 (1986).
108. Haveman, S. & Greene, E. Physiological and gene expression analysis of inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough by nitrite. *J. Bacteriology* **186**, 7944–7950 (2004).
109. Bursakov, S. *et al.* Enzymatic Properties and Effect of Ionic Strength on Periplasmic Nitrate Reductase (NAP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 816–822 (1997).
110. Silveira, C., Besson, S., Moura, I. Moura, J.J.G. & Almeida M.G. Measuring the Cytochrome Nitrite Reductase Activity—Practical Considerations on the Enzyme Assays. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2010**, 1–8 (2010).
111. Odom, J. M., Jessie, K., Knodel, E. & Emptage, M. Immunological Cross-Reactivities of Adenosine-5' -Phosphosulfate Reductases from Sulfate-Reducing and Sulfide-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 727–733 (1991).
112. Akagi, J. M. & Campbell, L. L. Studies on Thermophilic sulfate-reducing bacteria III *J. Bacteriol.* **84**, 1194–1201 (1962).

113. Steuber, J., Cypionka, H. & Kroneck, P.M.H. Mechanism of dissimilatory sulfite reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*: purification of a membrane-bound sulfite reductase and coupling with cytochrome c3 and hydrogenase. *Arch. Microbiol.* **162**, 255–260 (1994).